

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**INFLUENCE DE L'ALTÉRATION DE L'EXPRESSION DES
ISOFORMES DES RÉCEPTEURS DES ACIDES
RÉTINOÏQUES RAR β SUR L'EXPRESSION DES GÈNES
HOX DU GROUPE A**

**PAR
MARIE-EVE CARRIER**

**DÉPARTEMENT D'ANATOMIE ET BIOLOGIE
CELLULAIRE**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À LA FACULTÉ DE MÉDECINE
EN VUE DE L'OBTENTION
DU GRADE DE MAÎTRE ÈS SCIENCE (M. Sc.)
EN ANATOMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE**

15 SEPTEMBRE 2003



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-612-94814-5

Our file Notre référence

ISBN: 0-612-94814-5

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

RÉSUMÉ

INFLUENCE DE L'ALTÉRATION DE L'EXPRESSION DES ISOFORMES DES RÉCEPTEURS DES ACIDES RÉTINOÏQUES RAR β SUR L'EXPRESSION DES GÈNES *HOX* DU GROUPE A.

Marie-Eve Carrier

Département d'Anatomie et de biologie cellulaire, Faculté de Médecine,
Université de Sherbrooke.

Les gènes homéotiques sont reconnus pour jouer un rôle important dans le développement embryonnaire, mais aussi dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation cellulaire et de l'apoptose chez l'adulte. Lorsqu'ils sont exprimés de façon aberrante, les gènes homéotiques sont potentiellement oncogéniques. L'expression anormale des gènes homéotiques a d'ailleurs été relevée chez différents types de cancers tels que les cancers du poumon, du côlon, du sein et du rein et diverses leucémies. Dans un contexte cellulaire normal, l'expression de certains gènes homéotiques est directement contrôlée par les acides rétinoïques via les récepteurs nucléaires RAR et RXR. Chez des souris transgéniques présentant des altérations d'expression des différents isoformes de RAR β , nous avons analysé l'expression de plusieurs gènes Hox du complexe A. L'expression des gènes *Hoxa-1*, *Hoxa-2*, *Hoxa-5* et *Hoxa-7* a été trouvée fortement affectée dans les pneumocytes de type II, les cellules de Clara et les cellules cancéreuses

présentes dans les poumons. De plus, la présence de la protéine Hoxa-5 a été confirmée par immunobuvardage effectué à partir d'extraits de pneumocytes de type II. L'implication des différents gènes *Hox* analysés au cours de nos travaux dans l'oncogenèse est encore inconnue à ce jour. Nous soupçonnons cependant que certains gènes Hox sont oncosuppresseurs alors que d'autres sont oncogéniques.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	I
TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Le système pulmonaire.....	2
1.2 Les cancers pulmonaires.....	6
1.2.1 Les différents types de cancers pulmonaires	6
1.2.1.1 Les SCLC	6
1.2.1.2 Les NSCLC	7
1.2.3 L'origine des cancers pulmonaires.....	9
1.2.4 Implication des récepteurs des acides rétinoïques dans les cancers pulmonaires	12
1.3 Les récepteurs nucléaires répondant à l'acide rétinoïque.....	21
1.3.1 Généralités.....	21
1.3.2 Structure des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque.....	22
1.3.2.1 Les domaines modulateurs A et B.....	22
1.3.2.2 Domaine C.....	26
1.3.2.3 Domaine D.....	26
1.3.2.4 Les domaines E et F.	27

1.3.3	Signalisation via les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque	27
1.3.4	Gènes ciblés par le récepteur nucléaire RAR β	32
1.4	Les gènes homéotiques.....	34
1.4.1	Généralités.....	34
1.4.2	Les gènes homéotiques de classe I.....	35
1.4.3	Structure des protéines Hox.....	35
1.4.4	Expression des gènes <i>Hox</i>	38
1.4.5	Implications des protéines Hox dans l'oncogenèse.....	40
2.	OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....	43
3.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	45
3.1	Les souris transgéniques.....	46
3.1.1	Les différentes lignées de souris transgéniques	46
3.1.2	Identification des souris transgéniques	46
3.2	Observation des variations d'expression des gènes <i>Hox</i> du groupe A dans les modèles animaux.....	50
3.2.1	Évaluation histologique	50
3.2.2	Technique d'immunofluorescence	51
3.3	Immunobuvardage.....	55
3.3.1	Isolement et purification des pneumocytes de type II transgéniques et non transgéniques	55
3.3.2	Préparation et dosage des pneumocytes de type II pour l'immunobuvardage	60
3.3.3	Procédé d'immunobuvardage et marquage	60
4.	RÉSULTATS.....	63

4.1 Analyse de l'expression des protéines Hox du groupe A dans les souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE	64
4.1.1 Résultats du marquage contre la protéine Hoxa-1	65
4.1.1.1 Lignées RAR β 4-LIKE	66
4.1.2 Résultats du marquage contre la protéine Hoxa-2	72
4.1.2.1 Lignées AS-RAR β 1/ β 3	72
4.1.2.2 Lignées AS-RAR β 2	79
4.1.2.3 Lignées RAR β 4-LIKE	85
4.1.3 Résultats du marquage contre la protéine Hoxa-4	91
4.1.3.1 Lignées AS-RAR β 1/ β 3	91
4.1.3.2 Lignées AS-RAR β 2	98
4.1.3.3 Lignées RAR β 4-LIKE	105
4.1.4 Résultats du marquage contre la protéine Hoxa-5	111
4.1.4.1 Lignées AS-RAR β 1/ β 3	111
4.1.4.2 Lignées RAR β 4-LIKE	117
4.1.5 Résultats du marquage contre la protéine Hoxa-7	125
4.1.5.1 Lignées AS-RAR β 1/ β 3	125
5. DISCUSSION.....	132
6. CONCLUSIONS.....	152
7. REMERCIEMENTS.....	154
8. BIBLIOGRAPHIE.....	156

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Le poumon humain.....	4
Figure 2. Description du transgène antisens des souris AS-RAR β 1/ β 3.....	15
Figure 3. Description du transgène antisens des souris AS-RAR β 2.....	17
Figure 4. Description du transgène antisens des souris RAR β 4-LIKE.....	19
Figure 5. Les récepteurs nucléaires RAR β et leurs domaines fonctionnels	24
Figure 6. Activation et inactivation de la transcription via les RAR.....	30
Figure 7. Le complexe de gènes homéotiques.....	36
Figure 8. Montage de filtration de la suspension cellulaire totale.....	57
Figure 9. Variations d'expression de Hoxa-1 chez les souris transgéniques RAR β 4-LIKE	68
Figure 10. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-1 chez les cellules RAR β 4-LIKE	70
Figure 11. Variations d'expression de Hoxa-2 chez les souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3.....	75
Figure 12. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-2 chez les cellules AS-RAR β 1/ β 3.....	77
Figure 13. Variations d'expression de Hoxa-2 chez les souris transgéniques AS-RAR β 2.	81
Figure 14. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-2 chez les cellules AS-RAR β 2.....	83
Figure 15. Variations d'expression de Hoxa-2 chez les souris transgéniques RAR β 4-LIKE	87
Figure 16. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-2 chez les cellules RAR β 4-LIKE	89

Figure 17. Variations d'expression de Hoxa-4 chez les souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3	94
Figure 18. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-4 chez les cellules AS-RAR β 1/ β 3.....	96
Figure 19. Variations d'expression de Hoxa-4 chez les souris transgéniques AS-RAR β 2.	101
Figure 20. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-4 chez les cellules AS-RAR β 2	103
Figure 21. Variations d'expression de Hoxa-4 chez les souris transgéniques RAR β 4-LIKE	107
Figure 22. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-4 chez les cellules RAR β 4-LIKE	109
Figure 23. Variations d'expression de Hoxa-5 chez les souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3	113
Figure 24. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-5 chez les cellules AS-RAR β 1/ β 3.....	115
Figure 25. Variations d'expression de Hoxa-5 chez les souris transgéniques RAR β 4-LIKE	119
Figure 26. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-5 chez les cellules AS-RAR β 4-LIKE.....	121
Figure 27. Immunobuvardage de Hoxa-5 dans un isolat de pneumocytes de type II des lignées transgéniques RAR β 4-LIKE.....	123
Figure 28. Variations d'expression de Hoxa-7 chez les souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3	128
Figure 29. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-7 chez les cellules AS-RAR β 1/ β 3.....	130
Figure 30. Modèle d'action des différents récepteurs nucléaires RAR β sur la transcription du gène <i>Hoxa-2</i>	137

Figure 31. Modèle d'action des différents récepteurs nucléaires RAR β sur la transcription du gène <i>Hoxa-4</i>	140
--	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AF-1	Fonction activatrice ligand indépendante
AF-2	Fonction activatrice ligand-dépendante
ANP	Peptide atrial natriurétique («Atrial Natriuretic Peptide»)
AP-1	«Adaptator-related protein complex 1»
APAF-1	«Apoptotic protease activating factor 1»
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
AS	Antisens
AMP	Adénoside monophosphate
ATP	Adénoside triphosphate
Bak	«Bcl-2 antagonist killer»
Bax	«Bcl-2 associated X protein»
bHLH	«Basic helix-loop-helix domain»
BSA	Albumine de sérum bovin
CBP/P300	CREB-binding protein / E1A-binding protein 300 kDa
CDK	«Cyclin dependent kinase»
CoR box	Séquence protéique de liaison aux co-répresseurs
COUP-TF	«Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor»
CTE	Extrémité carboxy-terminale
dNTP	Désoxyribonucléotide
DR	Répétition directe
ER	Récepteurs des oestrogènes
E.T.	Écart-type
Exd	Protéine homéotique «Extradenticle»
FITC	Fluorescéine
FITH	«Fragile Histidine Triad»
Gènes <i>HOM C</i>	Complexe de gènes homéotiques chez la drosophile
Gènes <i>Hox</i>	Complexe de gènes homéotiques chez l'Humain
GRP	«Gastrin releasing polypeptide»
HDAC1	Histone déacétylase 1
IP	Palindrome inversé
kDa	Kilodalton
MMTV-LTR	«Mouse Mammary Tumor Virus-long translating region»
Msin3A	«Mammalian sin3A»
N-CoA	N-coactivateur
N-CoR	N-Co-répresseur

NSCLC	Cancer du poumon non à petites cellules
NSL	Signal de localisation nucléaire
nt	Nucléotide
NTG	Non transgénique
Pal	Séquence palindromique
PBS	Tampon phosphate salin
P/CAF	«p300 and CBP associated factors»
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PPAR γ	Récepteur proliférateur de péroxisomes γ
pRB	Protéine du rétinoblastome
p14 ^{ink4}	Protéine inhibitrice du cycle cellulaire de la famille ink4 14
p21 ^{waf/cip1}	Protéine inhibitrice du cycle cellulaire de la famille Waf/cip1 21
p53	Protéine p53
PTPRG	Récepteur pour la phosphatase gamma protéine-tyrosine
RA	Acides rétinoïques
RAS	Oncogène RAS
RARE	Éléments de réponse aux RA
RAR	Récepteur des RA
RASSF1	«RAS association domain family protein 1»
rpm	Rotations par minute
RXR	Récepteur des réxinoïdes
RXRE	Éléments de réponse aux réxinoïdes
SCLC	Cancer du poumon à petites cellules
SHP	«Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatases»
SMTR	«Silencing mediator of retinoid and thyroid receptors»
SP-A	Protéine du surfactant A
SP-B	Protéine du surfactant B
SP-C	Protéine du surfactant C
SP-D	Protéine du surfactant D
TAE	Tampon Tris, acétate et EDTA
TBST	«Tris buffered saline Tween 20»
TGF β	«Transforming growth factor β »
U	Unité
VHL	Von Hippel Lindau

1. INTRODUCTION

1.1 Le système pulmonaire

Le système pulmonaire est composé des voies respiratoires donnant accès aux poumons, des poumons ainsi que des systèmes musculaires et nerveux qui régulent la respiration (Campbell, 1995; Marieb, 1999). Ses principales fonctions sont d'assurer l'approvisionnement en oxygène nécessaire au métabolisme cellulaire et de débarrasser l'organisme d'un déchet métabolique libéré par les cellules, le gaz carbonique (CO₂, Marieb, 1999). Dans le système pulmonaire, les échanges gazeux sont effectués au niveau des alvéoles, via le système cardiovasculaire (Campbell, 1995; Marieb, 1999). Chaque alvéole contient plusieurs types cellulaires, dont les pneumocytes de type I, les pneumocytes de type II et les macrophages alvéolaires (figure 1; Marieb, 1999).

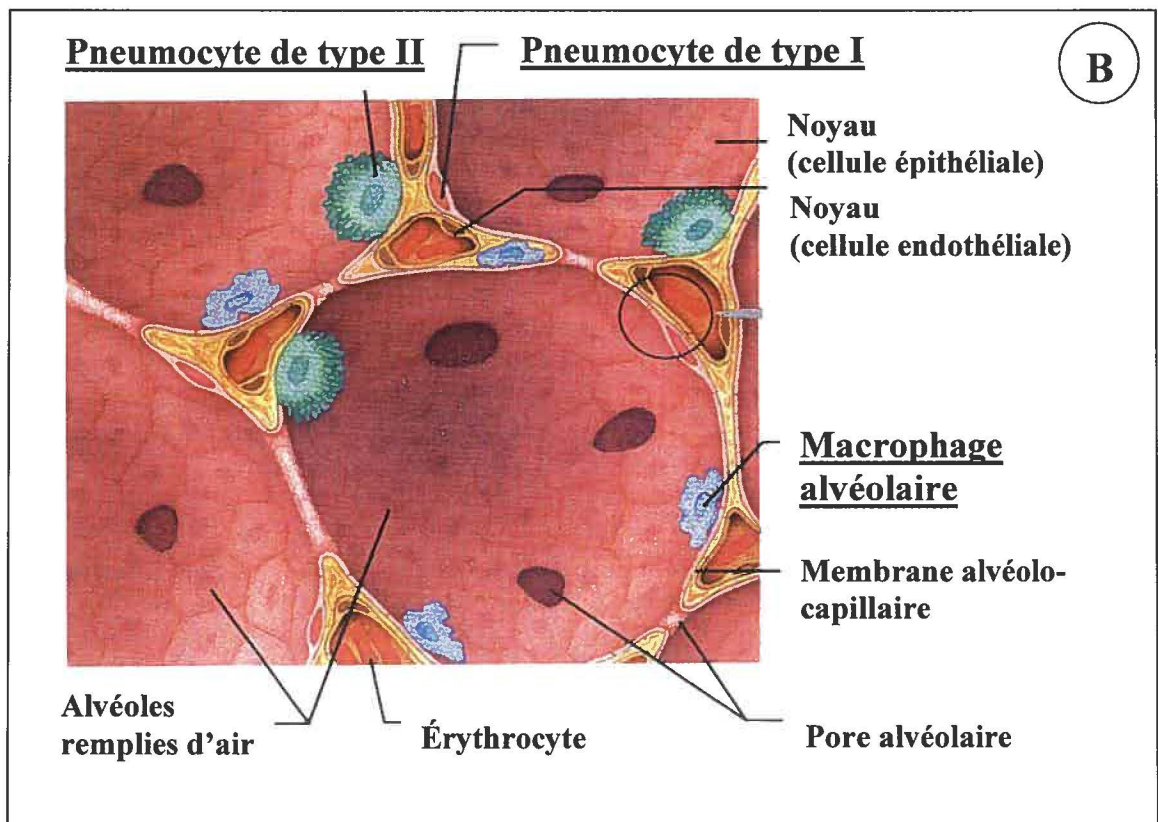
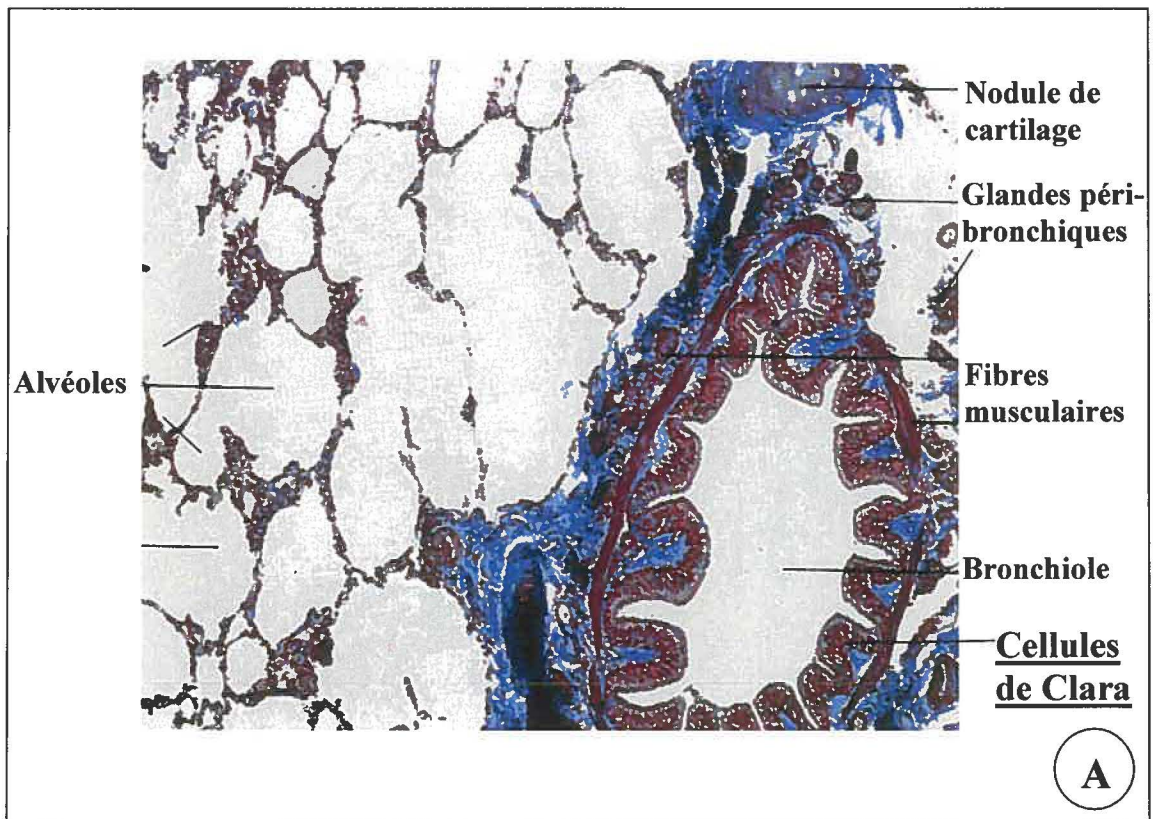
Les pneumocytes de type I sont des cellules épithéliales pavimenteuses qui tapissent la majorité des alvéoles. Ils assurent les échanges gazeux et leur différenciation cellulaire est terminale (Crestani et Aubier, 1995). Les pneumocytes de type II, de forme typiquement cuboïdale, sont retrouvés au niveau de l'épithélium alvéolaire. Contrairement aux pneumocytes de type I, ils sont différenciés de façon non-terminale (Crestani et Aubier 1995; Fehrenbach, 2001). Lorsque l'intégrité tissulaire des alvéoles est affectée, les pneumocytes de type II ont la capacité de se dé-différencier, de se multiplier et de se re-différencier en pneumocytes de type I ou de type II pour régénérer les tissus alvéolaires (Witschi, 1990). Au sein des alvéoles, les pneumocytes de type II effectuent la synthèse et la sécrétion des surfactants alvéolaires, une activité qu'ils

partagent avec les cellules de Clara de l'épithélium bronchique (figure 1 A; Mason et al., 2000). Dans la lumière des alvéoles, les surfactants diminuent la tension de la surface alvéolaire, ce qui empêche les alvéoles pulmonaires de s'affaisser sur elles-mêmes (Hills, 1999). Chez l'humain, les surfactants sont constitués d'approximativement 10% de protéines (incluant les protéines du surfactant SP-A, SP-B, SP-C et SP-D) et de 90% d'un mélange de lipides (composé principalement de phosphatidylcholine et de phosphatidylinositol; Harlan et al., 1966; Crestani et Aubier, 1995; Jobe et al., 2000; Fehrenbach, 2001).

Les macrophages alvéolaires sont, comme les surfactants, retrouvés à la surface des alvéoles. Ils éliminent les micro-organismes et les poussières qui atteignent les structures pulmonaires internes (Marieb, 1999). Une fois leur tâche accomplie, les macrophages alvéolaires sont transportés passivement hors des alvéoles par le courant ciliaire induit par les cellules ciliées bronchiques, jusqu'au pharynx (Van Winkle et al., 1995; Campbell, 1995; Marieb, 1999). Certains types de cancers pulmonaires auraient pour origine des cellules de Clara ou des pneumocytes de type II (Gazdar et al., 1983, 1990; Thaete et Malkinson, 1991).

Figure 1. Le poumon humain

En A, les principales structures du poumon humain sont présentées sur une coupe pulmonaire effectuée au niveau des bronches (Kühnel, 1997). Les tissus pulmonaires ont été colorés à l'éosine-hématoxyline. La bronchiole est facile à repérer grâce à sa muqueuse contractée (en forme d'étoile), formée de cellules bronchiques ciliées (cellules de Clara, soulignées). Remarquez la proximité relative des alvéoles et des bronchioles (dont la muqueuse est en forme d'étoile). Ces deux structures contiennent respectivement les pneumocytes de type II et les cellules de Clara. En B, la structure d'une alvéole a été grossie plusieurs fois afin de faciliter la visualisation de sa constitution cellulaire (Marieb, 1999). Les pneumocytes de type I, les pneumocytes de type II et les macrophages pulmonaires sont indiqués par un soulignement.



1.2 Les cancers pulmonaires

Le cancer est une pathologie caractérisée par une prolifération locale et aberrante de cellules qui se divisent de façon anarchique, qui sont non différenciées et qui résistent fortement à l'apoptose (Marieb, 1999; Greenberg et al., 2002; Ross et Rosen, 2002). Lorsque les cellules cancéreuses deviennent indépendantes de leur environnement, elles peuvent se détacher et s'ancrer ailleurs dans l'organisme pour créer des foyers cancéreux secondaires (métastases; Marieb, 1999). Au Canada, le cancer pulmonaire est la deuxième forme de cancer la plus diagnostiquée. Il représente le cancer le plus mortel tant pour l'homme que pour la femme. Jusqu'à 90% des cancers pulmonaires diagnostiqués sont mortels sur une période de cinq ans suivant le diagnostic initial (Santé Canada, 2002).

1.2.1 Les différents types de cancers pulmonaires

Les cancers pulmonaires sont divisés en deux classes selon l'expression de différents marqueurs, leur présentation clinique, leur étalement métastatique et leur réponse aux thérapies disponibles: les « cancers pulmonaires à petites cellules » (SCLC) et les « cancers pulmonaires non à petites cellules » (NSCLC; Travis, 2002).

1.2.1.1 Les SCLC

Les SCLC comprennent les formes les plus agressives et les plus mortelles de cancers pulmonaires. Ils constituent environ 20 % des cancers diagnostiqués (Matthews et Linnoila, 1988). Les SCLC débutent habituellement à la périphérie des bronches, au centre

des poumons. Ils forment des tumeurs de type neuroendocriniennes qui présentent une architecture floue et beaucoup de nécrose (Gould et al., 2000). Les cellules cancéreuses des SCLC sont rondes à fusiformes avec peu de cytoplasme, leur chromatine est fine et granulaire et leurs noyaux possèdent un nucléole discret (Flieder, 2002).

Présentement, les SCLC sont divisés en deux sous-groupes: les SCLC classiques et les SCLC variants. Les SCLC classiques expriment une panoplie de marqueurs neuroendocriniens présentant des granules de sécrétions neuronaux, de la L-dopa décarboxylase, de l'énolase neurone-spécifique, une isoenzyme créatine kinase du cerveau et produisant des peptides et des amines hormonales comme la GRP, la calcitonine, l'adrénocorticotropine, l'ANP, la sérotonine, etc. (Matthews et Linnoila, 1988; Linnoila, 1988). Contrairement à ceux-ci, les SCLC variants expriment faiblement et très peu de marqueurs neuroendocriniens : ils présentent une absence de granules de sécrétions, la perte de l'expression de plusieurs peptides hormonaux comme la GRP ou la calcitonine et une diminution de l'expression de certains marqueurs comme l'énolase spécifique aux neurones (Matthews et Linnoila, 1988). L'origine cellulaire des SCLC est encore inconnue.

1.2.1.2 Les NSCLC

Les NSCLC représentent 80% des cancers pulmonaires. Ils se développent plus lentement que les SCLC et sont beaucoup moins métastatiques que ceux-ci (Travis, 2002). On retrouve trois formes majeures de NSCLC chez l'homme: les adénocarcinomes

(31.5 % des cancers pulmonaires), les carcinomes squameux (29.4 % des cancers pulmonaires) et les carcinomes à grandes cellules (9.2 % des cancers pulmonaires).

Les adénocarcinomes sont généralement associés aux bronches et prennent naissance en périphérie des poumons (Mattews et Linnoila, 1988). Chez des fumeurs de cigarettes légères qui inhalent plus profondément la fumée dans leurs poumons, des adénocarcinomes de type bronchiolo-alvéolaires sont fréquemment observés (Franceschi et Bidoli, 1999). L'architecture tumorale des adénocarcinomes est au minimum 50% glandulaire (Gould, 2000). Les tumeurs sont sous forme de nodules solitaires, satellites ou de consolidation pulmonaire (Brambilla et Spiro, 2001). Au sein de l'adénocarcinome, les cellules cancéreuses sont histologiquement hétérogènes (Travis, 2002). Les pneumocytes de type II ou des cellules de Clara seraient les cellules d'origine des adénocarcinomes (Gazdar et al., 1983).

Les carcinomes squameux ou cancers épidermoïdes apparaissent généralement au centre des poumons dans les bronches segmentaires (Mattews et Linnoila, 1988; Travis, 2002). Les tumeurs épidermoïdes forment souvent des masses qui ont l'apparence d'une moisissure dans la lumière des bronches (Gould, 2000). Lorsqu'elles sont différenciées, elles contiennent des cellules cancéreuses qui créent des ponts intercellulaires, des structures squameuses en forme de perle et qui montrent une kératinisation individuelle (Travis, 2002). Les différents isoformes de la cytokératine observées (cytokératines 1, 5,

10 et 14) sont d'ailleurs des marqueurs tumoraux associés aux cancers épidermoïdes (Brambilla et al., 2000).

Les carcinomes à grandes cellules sont souvent associés à des carcinomes peu différenciés (Gould, 2000). Ils forment souvent des tumeurs en périphérie des poumons (Matthews et Linnoila, 1988). Les tumeurs des carcinomes à grandes cellules présentent des feuillets et des filets de grandes cellules polygonales ayant un cytoplasme abondant et un noyau vésiculaire qui contient un nucléole saillant (Travis, 2002). La biologie des cancers à grandes cellules est très similaire à celle des adénocarcinomes, c'est-à-dire qu'ils tendent à se développer aux mêmes sites pulmonaires et ont un comportement métastatique semblable (Yesner, 1985).

1.2.3 L'origine des cancers pulmonaires

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est causée par des modifications du bagage génétique comprenant des mutations ponctuelles de l'ADN cellulaire lors de la réplication de l'ADN (Kleinerman et al., 2000), mais surtout par l'exposition prolongée des cellules à des agents cancérogènes physiques (radiations ionisantes; Leenhouts et Brugmans, 2001), biologiques (virus oncogènes; Marieb, 1999; Furumoto et Ihara, 2002) ou chimiques (incluant notamment des produits du tabac, des hydrocarbures et de l'amiante; Minna, 1993; Bégin, 1998; Francheschi et Bidoli, 1999; Marieb, 1999; Chaturvedi et Chaturvedi, 2001). La cause majeure du développement des

cancers pulmonaires est le tabagisme ou l'exposition à la fumée secondaire de cigarette (75-80%; Cersosimo, 2002).

Les agents cancérigènes induisent différentes modifications dans le bagage génétique des cellules pulmonaires. Dans un premier temps, ils provoquent la mutation, l'inactivation ou la délétion de plusieurs gènes. Parmi les gènes souvent modifiés dans les cellules cancéreuses, on compte des gènes clés intimement liés au contrôle de la croissance et du cycle cellulaire des cellules pulmonaires codant pour les récepteurs cellulaires du TGF β et des acides rétinoïques (Zhang et al., 1996; Kang et al., 2000), les molécules de signalisation pRB, p16^{ink4} et p53 (Greenblatt et al., 1994; Kamb et al., 1994; Fong et al., 1999; Sharpless et DePinho, 2002; Campling et El-Deiry, 2003; Geradts, 2003) et la molécule d'attachement à la matrice extracellulaire nommée intégrine β_1 (Oshita et al., 2002). L'expression des gènes modifiés est altérée, parfois jusqu'au point où elle devient anormalement activée ou inactivée (Salgia et Skarin, 1998; Niklinska et al., 2001). Les cellules qui en sont porteuses perdent ou gagnent alors des capacités importantes liées au contrôle de la prolifération, de la survie ou de l'identité cellulaire (Salgia et Skarin, 1998; Ross et Rosen, 2002). L'accumulation des mutations dans leur ADN engendre des cellules cancéreuses typiques caractérisées par une division anarchique, une indifférenciation cellulaire et une forte résistance à l'apoptose (Greenberg et al., 2002; Ross et Rosen, 2002). Dans un second temps, les agents cancérigènes causent des altérations du nombre et de la structure des chromosomes cellulaires (Masuda et Takahashi, 2002). Les altérations structurales des chromosomes comprennent des

altérations de type microsatellites, des translocations, des amplifications de gènes, des épisomes (de l'ADN extra-chromosomique) et des délétions (Xu et al., 1996; Dang et al., 2000; Masuda et Takahashi, 2002; Koutsami et al., 2002). Dans les cellules cancéreuses pulmonaires, le chromosome 3p est affecté de délétions ou de translocations dans 90% des tumeurs SCLC et dans 50% des tumeurs NSCLC (Salgia et Skarin, 1998). Les délétions interstitielles du chromosome 3p dans les cancers couvrent les régions 3p14-cent, 3p21.3-3p23 et 3p25 (Hibi et al., 1992; Gazdar, 1994; Salgia et Skarin, 1998; Pitterle et al., 1998). Ces régions portent des gènes candidats potentiellement impliqués dans la genèse et la progression des cancers pulmonaires. La région 3p14-cent comprend le gène codant pour le récepteur protéine-tyrosine phosphatase gamma (PTPRG; Pitterle et al., 1998; Salgia et Skarin, 1998) et celui codant pour le Fragile Histidine triad (FHIT) impliqué dans le métabolisme du diadénosine tetra-phosphate en adénosine triphosphate (ATP) et en adénosine monophosphate (AMP; Pitterle et al., 1998; Salgia et Skarin, 1998; Zabarovsky et al., 2002). La région 3p21.3-3p23 inclut entre autres les gènes codant pour le récepteur type II répondant au TGF β (TGF β -R2; Mathew et al., 1994; Kang et al., 2000) et le « RAS association domain family protein » (RASSF1), une protéine présumée onco-suppressive ayant la capacité de se lier à l'oncogène RAS pour activer la différenciation cellulaire et l'apoptose (Dammann et al., 2000; Burbee et al., 2001; Zabarovsky et al., 2002). Enfin, la région 3p25 comprend le gène tumeur suppresseur VHL impliqué dans le syndrome de Von Hippel Lindau (Minna, 1993; Salgia et Skarin, 1998; Zabarovsky et al., 2002), le gène codant pour le récepteur nucléaire γ activé par les proliférateurs de peroxisomes (PPAR γ) qui pourrait être associé aux cancers pulmonaires

(Beamer *et al.*, 1997; Tsubouchi *et al.*, 2000) et le gène tumeur suppresseur codant pour le récepteur nucléaire à l'acide rétinoïque bêta (RAR β), un facteur transcriptionnel ayant la capacité d'activer plusieurs gènes impliqués dans l'oncogenèse pulmonaire (Mattei *et al.*, 1988; Bérard *et al.*, 1994, 1996; Salgia et Skarin, 1998; Zabarovsky *et al.*, 2002).

1.2.4 Implication des récepteurs des acides rétinoïques dans les cancers pulmonaires

Les acides rétinoïques (RA) jouent un rôle important dans l'embryologie et l'organogénèse pulmonaires, le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse, l'immunomodulation et l'expression d'oncogènes et de gènes supresseurs de tumeurs (Oikawa *et al.*, 1989; Chytil, 1996; Raz et Kelley, 1997; Rogers, 1997; Bérard *et al.*, 1997; Liaudet-Coopman *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Haidar *et al.*, 2000; Jinno *et al.*, 2002). Des carences alimentaires en RA et en vitamine A sont des facteurs de risques reconnus pour le développement du cancer du poumon (Minna et Mangelsdorf, 1997). De plus, des précurseurs des RA et certains analogues synthétiques ont été évalués en recherche clinique comme agents chimiopréventifs des cancers (Evans et Kaye, 1999; Dahl *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2000; Lippman et Lotan, 2000).

Diverses anomalies associées aux récepteurs nucléaires RAR β ont été identifiées dans la pathogenèse du cancer du poumon. En effet, l'expression du récepteur nucléaire RAR β , encodé dans la région chromosomique 3p24, est spécialement affectée dans les lignées cellulaires tumorales (Nervi *et al.*, 1991; Geradts *et al.*, 1993; Bérard *et al.*, 1994;

Zhang et al., 1994,1996) et dans les tumeurs pulmonaires elles-mêmes (Gebert et al., 1991; Houle et al., 1991; Kok et al., 1997). Environ 60% des NSCLC présentent une sous-expression de RAR β (Xu et al., 1997). De plus, l'isoforme RAR β 4 sans le domaine A présente un caractère oncogénique car sa sur-expression a souvent été notée dans des lignées cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires (Bérard et al., 1994). D'autre part, les cellules pulmonaires cancéreuses contiennent fréquemment une délétion d'une copie du gène du récepteur RAR β (Gebert et al., 1991; Nervi et al., 1991; Geradts et al., 1993). L'allèle restant est souvent inactivé par méthylation du promoteur (Zöchbauer-Müller et al., 2001; Suh et al., 2002). Dans les cas de cancers pulmonaires, du sein, du cou et de la tête, la méthylation du promoteur de RAR β mène à une inhibition de l'expression du gène de RAR β (Virmani et al., 2001; Zou et al., 2001; Sirchia et al., 2002). Aussi, le rétablissement de l'expression de RAR β 2 chez différentes lignées cellulaires et la xénogreffe de cellules cancéreuses squameuses du poumon transfectées par RAR β ont conduit respectivement à la suppression de la prolifération tumorale *in vitro* et *in vivo* (Houle et al. 1993; Xu et al., 1997; Lokshin et al., 1999). Enfin, la restauration de l'expression de RAR β conduit parfois les cellules cancéreuses à une différenciation terminale (Crowe, 1998; Lokshin et al., 1999). La perte d'expression de RAR β est fort probablement en lien direct avec la diminution du contrôle de la prolifération des lignées cellulaires dérivées de SCLC et de NSCLC *in vitro* par l'acide rétinoïque (Geradts et al., 1993; Houle et al., 1993; Li et al., 1998).

Certaines tumeurs toutefois sur-expriment RAR β (Viallet et al., 1991). Des lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinomes pulmonaires sur-expriment également l'isoforme RAR β 4 qui ne présente pas le domaine A (Bérard et al., 1994). Si ces cellules à caractère cancéreux étaient traitées aux RA, il est probable qu'aucun effet sur la prolifération et l'apoptose cellulaire ne serait remarqué, tels qu'il a été observé chez quelques lignées cellulaires dérivées de cancers pulmonaires (Geradts et al., 1993; Zhang et al., 1994). Dans ce contexte, la sur-expression de RAR β 4 ou des déféctuosités au niveau des corégulateurs serait en partie responsable de l'absence de réponse positive au traitement avec les RA (Geradts et al., 1993; Zhang et al., 1994; Moghal et al., 1995).

Dans notre laboratoire, nous possédons des lignées de souris transgéniques qui expriment un ARN antisens dirigé contre l'ARNm des isoformes RAR β 1 et RAR β 3 d'une part, et RAR β 2 (souris AS-RAR β 1/RAR β 3 et AS-RAR β 2; figure 2 et 3; Bérard et al., 1996, 1997). Les souris de ces lignées sous-expriment les récepteurs nucléaires RAR β 1 et RAR β 3 d'une part, et RAR β 2 d'autre part. Toutes ces souris démontrent une tendance marquée à développer des cancers pulmonaires, spécialement celles des lignées sous-exprimant l'isoforme RAR β 2 et sur-exprimant l'isoforme RAR β 4-LIKE (figure 4; Bérard et al., 1994, 1996).

Figure 2. Description du transgène antisens des souris AS-RAR β 1/ β 3

Une portion de l'ADNc commune aux domaines A des isoformes RAR β 1 et RAR β 3 a été inversée en aval du promoteur MMTV-LTR. Le transgène produit un ARN antisens dirigé simultanément contre les domaines A des deux isoformes. Cet ARN antisens peut s'hybrider à la région entourant le codon d'initiation de la traduction de l'ARNm de RAR β 1 et de RAR β 3. Le transgène inclut un signal de polyadénylation de SV40 dont l'épissage indique que le transgène est bel et bien exprimé. L'expression de ces isoformes est considérablement diminuée par l'expression de l'ARN antisens (Bérard et al., 1997).

Souris Transgéniques AS-RAR $\beta 1/\beta 3$

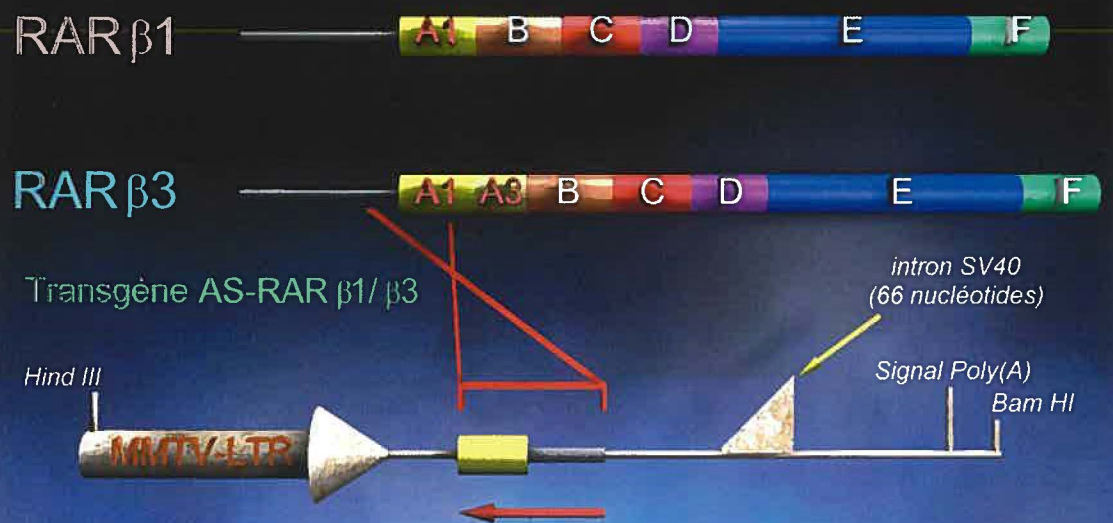


Figure 3. Description du transgène antisens des souris AS-RAR β 2

Une portion de l'ADNc de l'isoforme RAR β 2 a été inversée en aval du promoteur MMTV-LTR. Le transgène produit un ARN antisens dirigé contre le domaine A de l'isoforme RAR β 2. Cet ARN antisens s'hybride avec la région entourant le codon d'initiation de la traduction de l'ARNm de RAR β 2. Le transgène inclut un signal de polyadénylation de SV40 dont l'épissage indique que le transgène est bel et bien exprimé. L'expression de cet isoforme est considérablement diminuée dans les cellules exprimant l'ARN antisens (Bérard et al., 1996).

Souris Transgéniques AS-RAR β 2

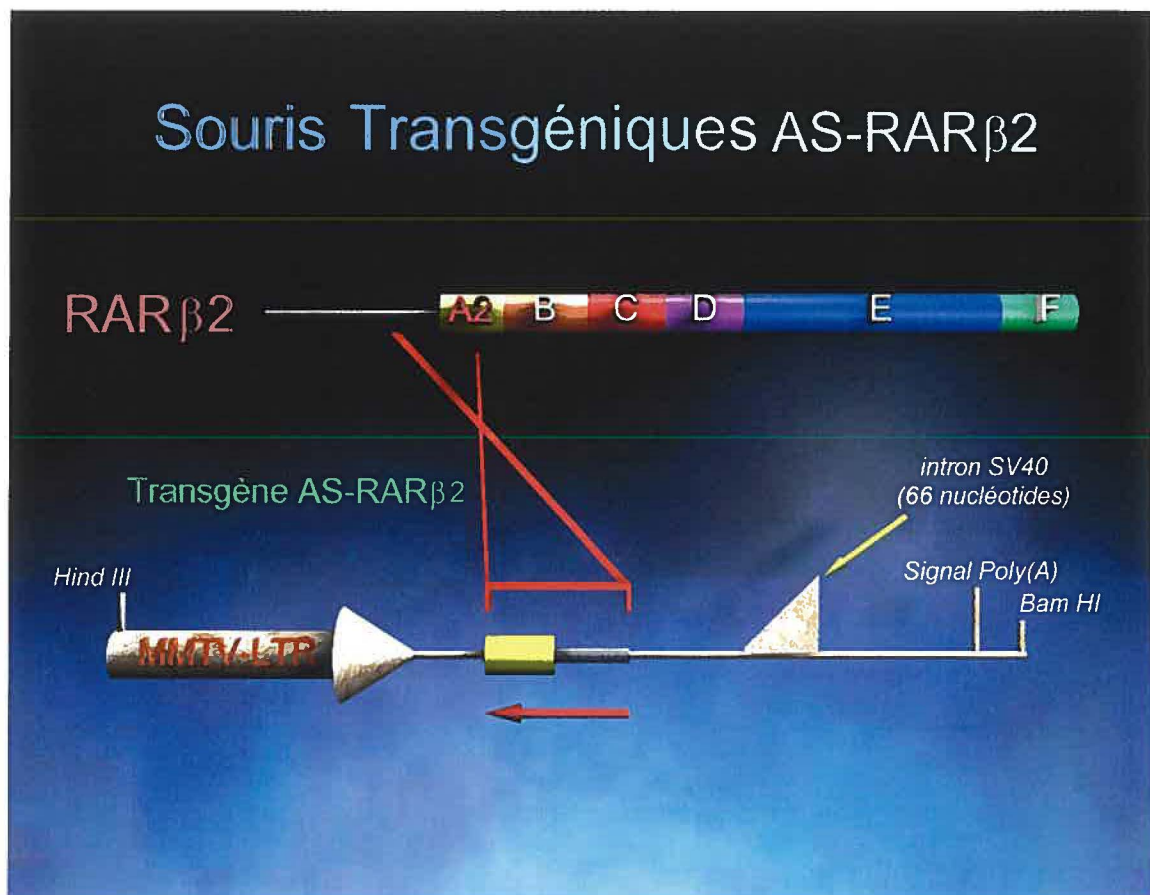
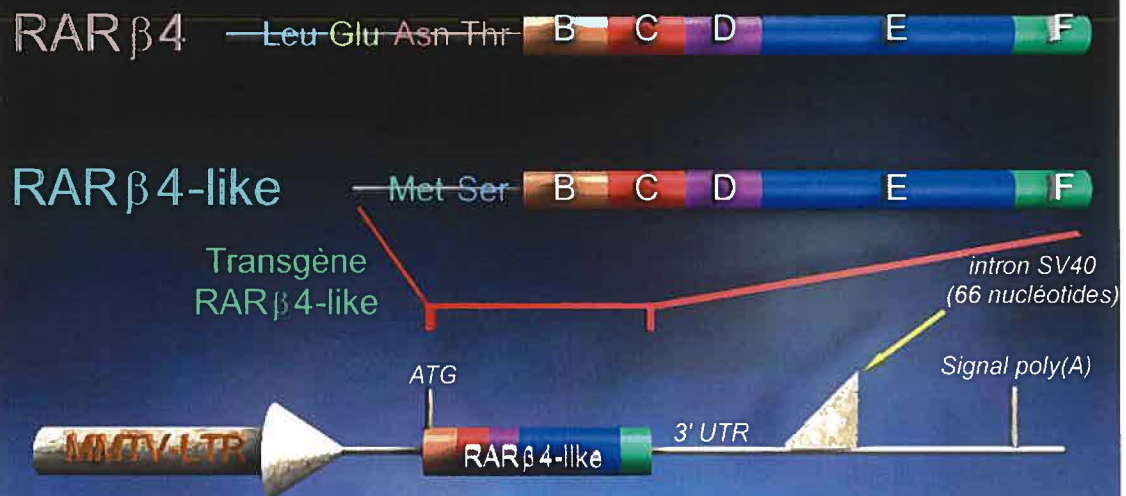


Figure 4. Description du transgène des souris RAR β 4-LIKE

Le transgène RAR β 4-LIKE est constitué d'un ADNc modifié de RAR β 4 qui comporte un codon d'initiation de type ATG au lieu du CTG normalement retrouvé dans le gène murin. Il est inséré en aval du promoteur MMTV-LTR. Le transgène inclut un signal de polyadénylation de SV40 dont l'épissage indique que le transgène est bel et bien exprimé. L'expression de l'isoforme RAR β 4-LIKE est augmentée dans les souris exprimant le transgène (Bérard et al., 1994).

Souris Transgéniques RAR β 4-like



1.3 Les récepteurs nucléaires répondant à l'acide rétinoïque

1.3.1 Généralités

Les récepteurs nucléaires répondant aux acides rétinoïques naturels et synthétiques (désignés par le terme rétinoïdes ou RA) appartiennent à la famille des récepteurs stéroïdiens-thyroïdiens (Nagpal et al., 1992; Giguère, 1994; Piedrafita et Pfahl, 1999; Thacher et al., 2000). Selon leurs préférences de ligands et leurs séquences protéiques, les récepteurs nucléaires des RA sont classés en deux sous-familles: les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) et les récepteurs des réxinoïdes (RXR pour «retinoid-X-receptor»; Giguère, 1994; Chambon, 1996; Piedrafita et Pfahl, 1999). Les RAR, qui sont les principaux effecteurs de la signalisation induite par les RA, lient le 9-cis RA, l'all-trans RA et les dérivés de la vitamine A (désignés globalement comme les rétinoïdes; Thacher et al., 2000). Pour leur part, les RXR lient seulement le 9-cis RA et les réxinoïdes, qui sont leurs ligands synthétiques hautement spécifiques (Sporn et Suh, 2002).

Chaque famille de récepteurs nucléaires comporte trois isotypes encodés par des gènes différents (RAR α , β , γ et RXR α , β , γ ; Giguère et al, 1987, 1990; Petkovich et al., 1987; Benbrook et al., 1988; Brand et al., 1988; Krust et al., 1989; Zelent et al., 1989; Mangelsdorf et al., 1990, 1992; Piedrafita et Pfahl, 1999; Thacher et al., 2000). Les gènes RAR α , β et γ sont respectivement sur le chromosome 17q21.1, 3p24 et 12q13 (Mattei et

al., 1988; Chambon, 1996), alors que ceux des RXR α , β et γ sont respectivement situés sur les chromosomes 9q34.3, 6p21.3 et 1q22-q23 (Chambon, 1996). L'usage de deux promoteurs en tandem, de codons alternatifs d'initiation de la traduction et de l'épissage alternatif permet de générer huit isoformes de RAR et sept isoformes de RXR à partir de ces gènes (Zelent et al., 1991; Lehmann et al., 1991; Nagpal et al., 1992). Parmi les isoformes de RAR, quatre sont des isoformes encodés par le gène de RAR β situé dans la région 3p24 du chromosome 3p (figure 5 A; Mattei et al., 1988; Chambon, 1996). Nous savons que la région 3p24 est fréquemment délétée dans les cellules cancéreuses pulmonaires et qu'une perte d'expression de RAR β par méthylation du promoteur est observée (Zöchbauer-Müller et al., 2001; Suh et al., 2002; Zabarovsky et al., 2002). De plus, nos modèles animaux démontrent que le gène RAR β serait en cause dans l'apparition des cancers pulmonaires (Bérard et al., 1994, 1996).

1.3.2 Structure des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque

Les récepteurs à l'acide rétinoïque RAR et RXR possèdent six domaines fonctionnels désignés chacun par une lettre (A, B, C, D, E ou F; figure 5 B; Chambon, 1996).

1.3.2.1 Les domaines modulateurs A et B

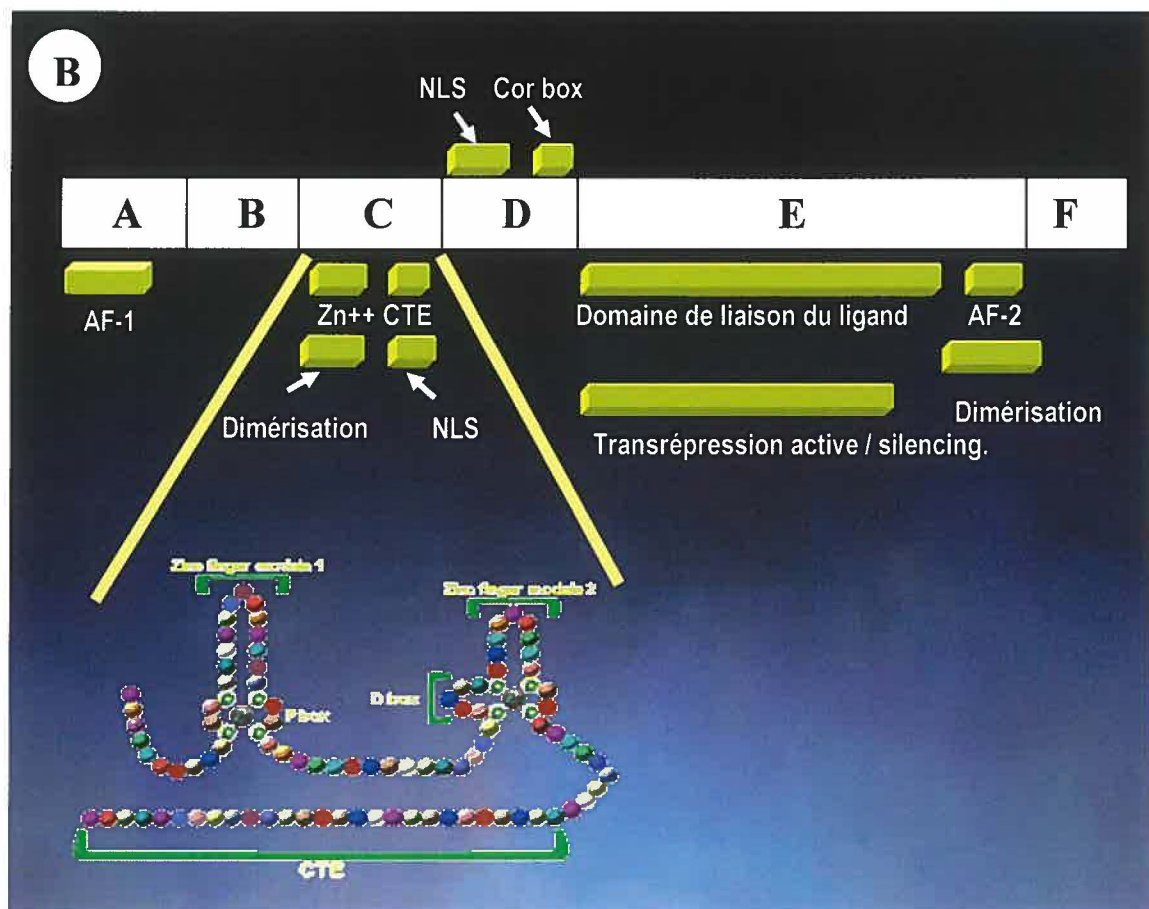
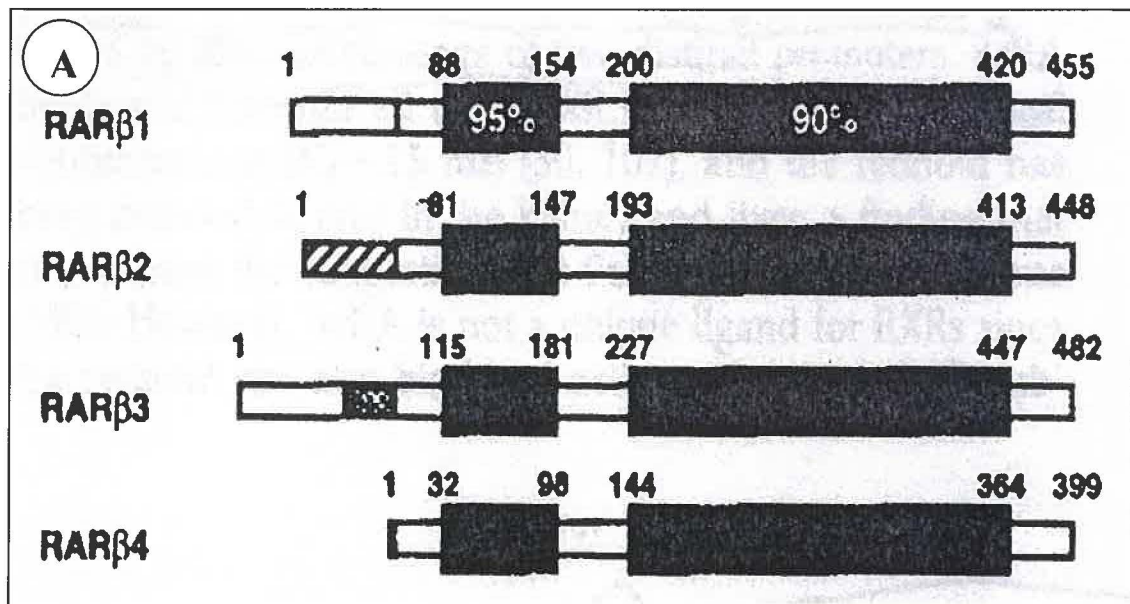
En N-terminal, les récepteurs à l'acide rétinoïque présentent les domaines A et B dits aussi domaines modulateurs (Aranda et Pascual, 2001). Le domaine A est très variable en terme de longueur et d'homologie de séquence chez les isoformes des

récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque. Sa variabilité est causée spécifiquement par l'usage de promoteurs en tandem, de codons d'initiation de la traduction multiples et par l'épissage alternatif (Lehmann et al., 1991; Zelent et al., 1991; Nagpal et al., 1992; Chambon, 1996). Les domaines B à F sont conservés entre les isoformes d'un même isotype de RAR ou de RXR (Chambon, 1996).

Les domaines A et B incluent une fonction de transactivation ligand indépendante appelée AF-1 (Nagpal et al., 1993). En absence des rétinoïdes, la fonction AF-1 a pour rôle de maintenir une activité transcriptionnelle de base des gènes régulés par les récepteurs des RA (Nagpal et al., 1992, 1993; Folkers et al., 1993). Son activité est spécifique à certains tissus et est fonction du type de promoteur (Nagpal et al., 1992; Mader et al., 1993; Aranda et Pascual, 2001). De plus, elle est sujette à une régulation positive par la phosphorylation de certains résidus par les protéines kinases cycline-dépendante (CDK2, CDK7; Folkers et al., 1993; Rogatsky et al., 1999; Bastien et al., 2000). L'isoforme RAR β 4 est le seul sans domaine A, donc sans domaine de transactivation AF-1 (Giguère, 1994). Pour cette raison, l'isoforme RAR β 4 pourrait avoir une capacité de transactivation moins efficace pour certains promoteurs qu'il cible même en présence du ligand (Nagpal et al., 1992). À l'extrême, RAR β 4 pourrait aussi agir en tant qu'isoforme dominant négatif dans les tumeurs le surexprimant comme les tumeurs mammaires humaines (Sommer et al., 1999; Soprano et al., 2000).

Figure 5. Les récepteurs nucléaires RAR β et leurs domaines fonctionnels

En A sont présentés les isoformes du récepteur RAR β qui ont été caractérisés chez la souris (Giguère, 1994). Les boîtes noires situent les domaines de liaison à l'ADN et au ligand. Le pourcentage d'identité de ces régions avec celles du récepteur RAR α est indiqué. Les boîtes hachurées et pointillées indiquent les régions N-terminales générées par épissage alternatif. Les nombres au haut de chaque boîte indiquent les acides aminés limitant chaque domaine fonctionnel ainsi que la longueur totale de la protéine. En B, les six domaines fonctionnels des récepteurs à l'acide rétinoïque sont décrits. Tous sont généralement bien conservés entre les espèces, sauf les domaines A et D qui présentent beaucoup de variabilité. Le domaine C est agrandi sur la figure afin de mettre en évidence les deux doigts de zinc impliqués dans les interactions des récepteurs avec l'ADN.



1.3.2.2 Domaine C

Le domaine C, le plus conservé des récepteurs nucléaires, est responsable de la liaison à l'ADN (Kumar et Thompson, 1999). Le domaine C est composé de deux motifs en doigts de zinc qui comprennent 60 à 70 acides aminés et d'une extension carboxy-terminale (CTE; Kumar et Thompson, 1999; Aranda et Pascual, 2001). Dans le premier motif, la boîte P confère la spécificité de reconnaissance de l'élément de réponse à l'acide rétinoïque dans l'ADN (Kumar et Thompson, 1999). Dans le second, la boîte D est impliquée dans la dimérisation des récepteurs nucléaires (Kumar et Thompson, 1999; Aranda et Pascual, 2001). L'extension carboxy-terminale suivant les deux motifs fournit des interfaces protéines-ADN et des interfaces protéines-protéines (Yang et al., 1991; Hsu et al., 1998; Hsieh, et al., 1999; Melvin et al. 2002).

1.3.2.3 Domaine D

Le domaine charnière D est hypervariable en terme de longueur et d'homologie (Aranda et Pascual, 2001). Très flexible, il permet au domaine de liaison à l'ADN une rotation de 180° afin que les récepteurs nucléaires puissent se lier sous forme de dimères sur des éléments de réponse formés de demi-sites possédant des orientations diverses (Piedrafita et Pfahl, 1999). Le domaine D possède des sites de reconnaissance, de modifications post-traductionnelles tels qu'un site d'acétylation par CBP/p300 et qu'un site de phosphorylation (Delmotte et al., 1999; Wang et al., 2001) ainsi que des sites de liaison à des co-répresseurs (CoR box; Horlein et al., 1995; Miyamoto et al., 2001). De

plus, il inclut chez certains récepteurs, dont celui de la vitamine D₃, un signal de localisation nucléaire (NLS; Picard et Yamamoto, 1987; Michigami et al., 1999).

1.3.2.4 Les domaines E et F

Le domaine E est hautement conservé entre les isotypes de RAR (94 –97 %) et de RXR (91-97 %; Chambon, 1996). Il contient un domaine de liaison au ligand, une fonction de transactivation ligand-dépendante (AF-2) et une interface de dimérisation (Chambon, 1996; Perlmann et al., 1996; Wurtz et al., 1996; Kumar et Thompson, 1999; Aranda and Pascual, 2001). Le domaine E comporte également une fonction de transrépression active (silencing; Baniahmad, 1992). En absence de RA dans le milieu cellulaire, le domaine de transrépression inhibe la transactivation des gènes ciblés par les récepteurs nucléaires des RA. En présence de RA, la fonction AF-2 est activée et l'inhibition de la transactivation par la fonction de transrépression active est relevée (Qui et al., 1995). La fonction AF-2 fonctionne en synergie avec le domaine de transactivation ligand indépendant AF-1 du domaine A (Nagpal et al., 1993). Aucune fonction n'a été associée au domaine F à ce jour. Celui-ci n'est présent que chez les RAR (Giguère, 1994; Chambon, 1996).

1.3.3 Signalisation via les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque

Dans la cellule, les RAR et RXR sont retrouvés au noyau, sous forme d'hétérodimères constamment liés à l'ADN (Piedrafita et Pfahl, 1999). Les RXR sont les

principaux partenaires d'hétérodimérisation des RAR (Leid et al., 1992). Leur liaison au 9cis-RA amplifie la transactivation génique induite par les RAR (Minucci et al., 1997). Les RAR et les RXR lient des éléments de réponse aux RA nommés respectivement «retinoic acid responsive element» (RARE) ou «rexinoid responsive element» (RXRE; Piedrafita et Pfahl, 1999).

Les RARE et les RXRE sont généralement composés de deux séquences consensus (PuGGTCA pour les RAR; Sucov et al., 1990; Giguère, 1994) d'ADN ou demi-sites, situées à proximité l'une de l'autre dans l'ADN (Piedrafita et Pfahl, 1999). Dans les RARE, les demi-sites sont le plus souvent disposés en répétition directe et sont séparés par deux, quatre, cinq ou huit nucléotides. Aussi, portent-ils les noms DR-1, DR-2, DR-4, DR-5 ou DR-8, selon le nombre de nucléotides qui sépare les deux demi-sites (Giguère, 1994; Clagett-Dame et Plum, 1997; Piedrafita et Pfahl, 1999). Les demi-sites des RARE peuvent aussi être disposés selon des arrangements palindromiques (Pal-0, Pal-9), de palindromes inversés séparés par 6 ou 8 nucléotides (IP-6 et IP-8) ou encore d'agencements complexes de plusieurs séquences consensus dans le génome (Clagett-Dame et Plum, 1997; Piedrafita et Pfahl, 1999). L'arrangement des deux demi-sites consensus est important pour la détermination du type d'hétérodimère ou d'homodimère qui se liera au RARE ou au RXRE (Piedrafita et Pfahl, 1999).

L'hétérodimère RAR/RXR lié aux RARE interagit avec des complexes protéiques qui répriment ou activent la transcription des gènes selon l'absence ou la présence des RA

dans la cellule (figure 6; Piedrafita et Pfahl, 1999). En absence de RA, le dimère de récepteurs lie le RARE et un complexe répresseur qui comprend un co-répresseur (N-CoR/SMRT), une molécule adaptatrice qui recrute les histones déacétylases (mSin3) et une histone déacétylase (HDAC1; figure 6; Alland et al., 1997; Heinz et al., 1997; Aranda et Pascual, 2001; Cohen et al., 2001). Celui-ci désacétyle les histones entourant le promoteur du gène qui contient le RARE. Suite à cette modification, la structure de la chromatine contenant les histones désacétylées devient plus compacte, ce qui diminue l'accès de la machinerie transcriptionnelle de base au promoteur et par le fait même réprime la transcription du gène qui contient le RARE (Piedrafita et Pfahl, 1999). Lorsque les RA sont présents dans la cellule, ils pénètrent le noyau par diffusion simple où ils lient les RAR et les RXR (Thacher, 2000). Suite à la liaison des RA, les RAR et les RXR subissent un changement allostérique de leur conformation qui cause le détachement du complexe d'inhibition de l'hétérodimère (Germain et al., 2002). Le site d'interaction étant disponible, un complexe d'activation composé d'un co-activateur (N-CoA), d'un co-intégrateur (CBP/p300) et de son facteur d'association (P/CAF) peut alors se lier à l'hétérodimère (figure 6; Chakravarti et al., 1996; Yang et al., 1996; Westin et al., 1998; Piedrafita et Pfahl, 1999; Aranda et Pascual, 2001). Les protéines CBP/p300 et P/CAF

Figure 6. Activation et inactivation de la transcription via les RAR

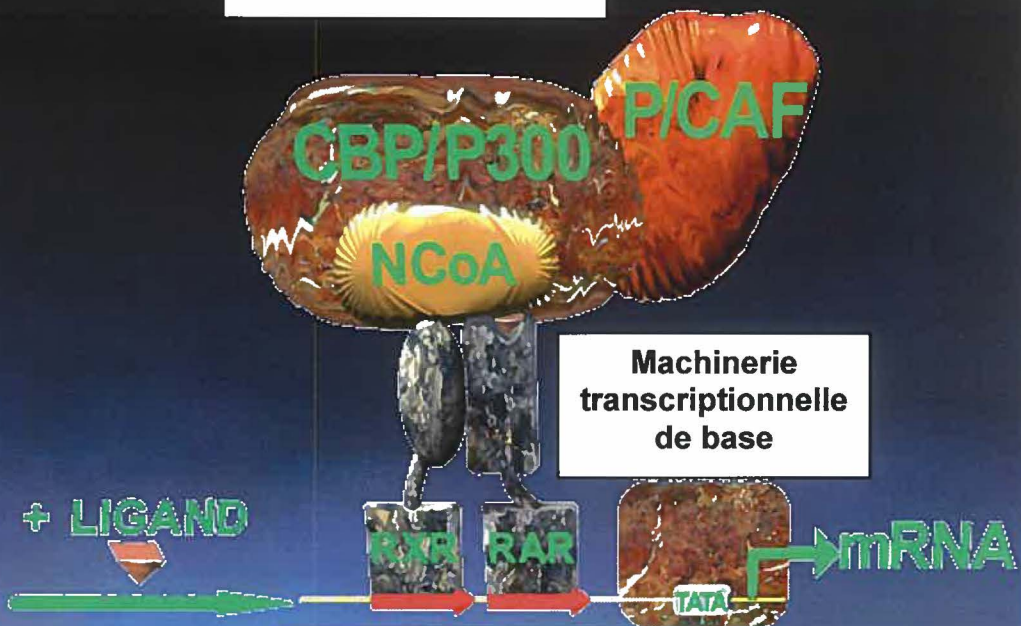
En absence des RA, le dimère de récepteurs nucléaires RAR/RXR est lié à un complexe répresseur qui réprime la transcription génique via la déacétylation des histones de l'ADN. Dans ce contexte, l'ADN est moins accessible à la machinerie transcriptionnelle. En présence du ligand, le dimère RAR/RXR change de conformation tridimensionnelle, ce qui provoque le largage du complexe répresseur. Dès lors, un complexe d'activation porteur d'une activité histone acétylase peut lier le dimère RAR/RXR. Lorsque les histones de la chromatine sont acétylées, la machinerie transcriptionnelle accède plus facilement à l'ADN, ce qui favorise la transcription des gènes.

Répression



Déacétylation des histones

Activation



Acétylation des histones

acétylent les histones de la chromatine via leur activité histone-acétyl-transférase (Ogryzko et al., 1996; Yang et al., 1996). La chromatine acétylée présente une structure plus ouverte qui permet à la machinerie transcriptionnelle de base d'avoir un accès plus facile au promoteur des gènes ciblés par les RARE et d'initier leur transcription (figure 6; Piedrafita et Pfahl, 1999).

La modulation de la transcription génique peut être influencée par la disponibilité des RAR et des RXR dans le noyau. Les RAR et les RXR sont susceptibles de s'hétérodimériser avec divers autres récepteurs nucléaires. Par exemple, les RAR peuvent lier aussi le partenaire hétérodimérique d'inhibition SHP (Klinge et al., 2001), les récepteurs de l'œstrogène (ER α et β ; Song et al., 1998) et COUP-TF («chicken ovalbumine upstream promoter-transcription factor»; COUP α , β et γ ; Berrodin et al., 1992). Il en est de même pour les RXR, qui peuvent en plus s'homodimériser en présence de 9-cisRA. Ce faisant, ils induisent une réponse tout à fait divergente de celle induite par l'hétérodimère RAR/RXR en favorisant la transcription de gènes différents de ceux transcrits lorsqu'ils sont les co-régulateurs des RAR (Berrodin et al., 1992).

1.3.4 Gènes ciblés par le récepteur nucléaire RAR β

Chez les organismes vivants, les RA sont impliqués dans la formation des os, l'immunomodulation, les métabolismes du glucose et des lipides, la différenciation et la prolifération cellulaire, l'oncogenèse et le développement embryonnaire (Thacher et al., 2000). Ils exercent leur action via les récepteurs nucléaires RAR, en favorisant la

transcription spécifique de gènes cibles (Piedrafita et Pfahl, 1999). Plusieurs évidences suggèrent que le récepteur nucléaire RAR β module l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire. Lorsque RAR β est surexprimé dans des lignées cellulaires de carcinomes squameux, l'expression des protéines apoptotiques Bax, Bak, Apaf-1 et des caspases 1 et 9 est augmentée (Hayashi et al., 2001). D'autre part, RAR β possède une activité anti-cancéreuse unique, partiellement due à une activité anti-AP-1 (Lin et al., 2001). Il serait impliqué également dans l'expression des gènes homéotiques *Hoxb-4* et *Hoxd-4* (Folberg et al., 1999), qui participent activement à l'organisation des structures embryonnaires lors du développement (Favier et Dollé, 1997; Galis, 1999; Wahba et al., 2001).

1.4 Les gènes homéotiques

1.4.1 Généralités

Au cours des années 70, la transformation d'une partie du corps en une structure ressemblant à une autre (dite transformation homéotique) a été beaucoup étudiée (Lewis, 1978). L'observation des différentes transformations homéotiques rencontrées chez la drosophile a mené à l'identification des gènes homéotiques *HOM-C/Hox* (Lewis, 1978). Rapidement, ces gènes ont été répertoriés dans de nombreux autres organismes vivants allant de l'hydre, en passant par les nématodes et les vertébrés, incluant la souris et l'homme (Bucan et al., 1986; Rabin et al., 1986; McGinnis, 1992). Les gènes homéotiques possèdent tous un domaine de liaison à l'ADN nommé homéodomaine (Ghering, 1993). Ils sont classés selon la similarité de la séquence de leur homéodomaine par rapport à ceux de la drosophile (Maconochie et al., 1996). Dans l'organisme, les gènes homéotiques sont impliqués particulièrement dans l'organogénèse et la spécification axiale des différentes structures lors du développement embryonnaire (Kostic et Capecchi, 1994; Papageorgiou et Almirantis, 1996; Favier et Dollé, 1997; Galis, 1999; Malpel et al., 2000; Wahba et al., 2001; Goodman, 2002). Ils agissent en tant que facteurs de transcription influençant le destin des cellules de l'organisme.

1.4.2 Les gènes homéotiques de classe I

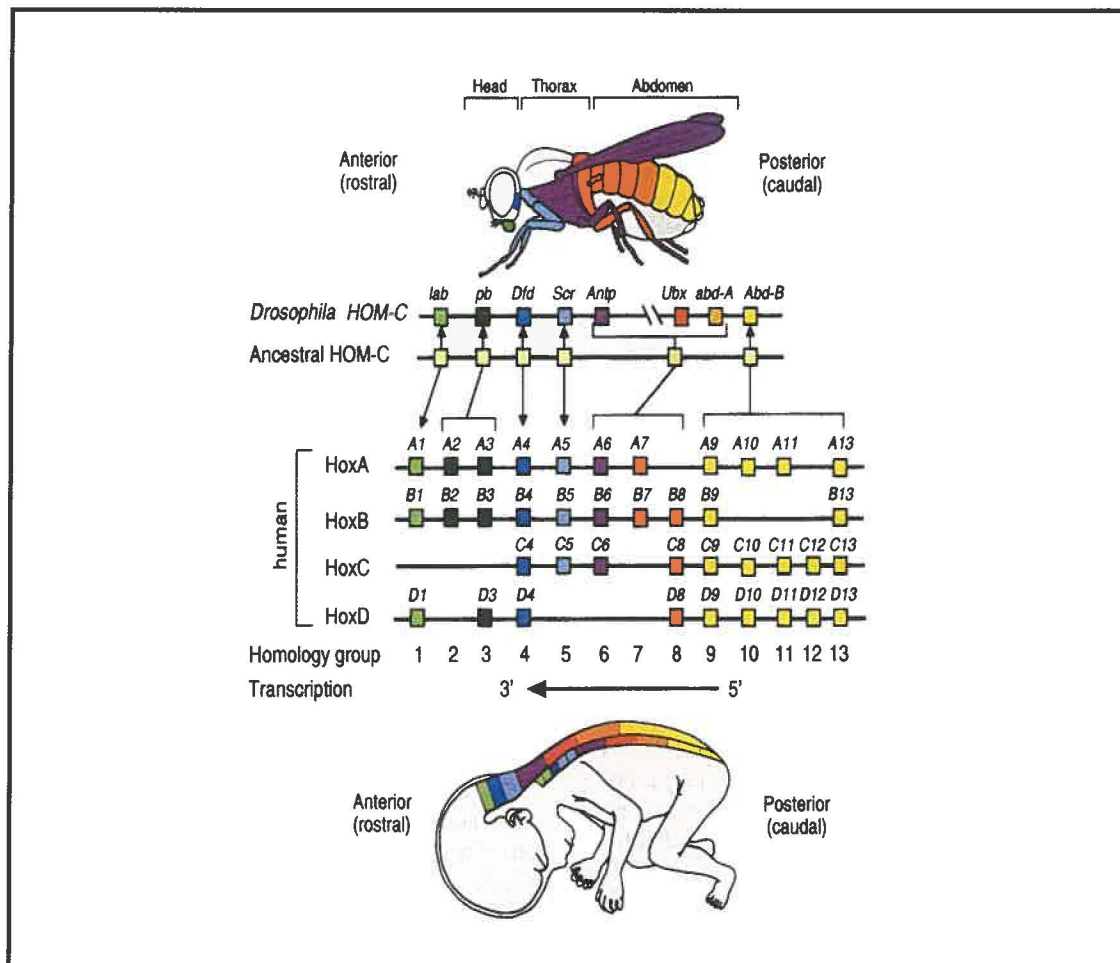
Les gènes homéotiques de classe I (*Hox*) possèdent la séquence consensus homologue à l'homéodomaine du gène homéotique *Antp* de la drosophile (Cillo et al., 1999). Les mammifères possèdent 39 gènes homéotiques de classe I qui sont distribués dans quatre complexes générés par la double duplication d'un complexe ancestral (Apiou et al., 1996; Maconochie et al., 1996). Les complexes de gènes homéotiques humains portent les noms HOXA, HOXB, HOXC et HOXD (figure 7; Apiou et al., 1996). Ils sont respectivement situés sur les chromosomes humains 7, 17, 12 et 2 (Apiou et al., 1996). Chacun inclut de neuf à onze gènes qui sont colinéaires (Lufkin, 1997). En comparant les gènes des complexes, il est possible de former 13 groupes paralogues inter-complexes (Maconochie et al., 1996; Sharkey et al., 1997). Les gènes d'un même groupe paralogue sont plus similaires entre eux qu'avec les autres gènes de leurs complexes respectifs et ont des fonctions redondantes dans l'organisme (Maconochie et al., 1996).

1.4.3 Structure des protéines Hox

L'homéodomaine caractéristique des protéines Hox comprend 60 acides aminés encodés par une séquence de 180 nucléotides (l'homéoboîte; McGinnis et al., 1984). Sa structure tridimensionnelle est caractérisée par quatre hélices alpha disposées en un motif hélice-tour-hélice (Ghering, 1993). Lors de la liaison des protéines HOX à l'ADN, les hélices trois et quatre du motif sont en contact direct avec le sillon majeur de l'ADN, près de la séquence 5'-GAAAGCCATTAGAG-3', dérivée de la séquence consensus 5'-T₁N₂A₃T₄ (G/T)₅(G/A)₆-3' typiquement ciblée par les gènes HOX (Muller et al. 1988;

Figure 7. Le complexe de gènes homéotiques

L'organisation génomique et le patron d'expression colinéaire des gènes HOM chez la drosophile est ici présenté en parallèle avec celui des gènes *Hox* chez les mammifères. Chaque gène est représenté par une boîte colorée. Les domaines d'expression sont schématisés dans une mouche et chez un embryon humain (à partir d'extrapolation des observations effectuées sur des modèles murins). Pour simplifier la figure, la superposition partielle de l'expression des protéines Hox a été supprimée chez la drosophile et l'embryon humain. Chaque couleur a été sélectionnée pour montrer l'intensité d'expression et le lieu d'action de chaque gène homéotique. (Mark et al., 1997).



Ghering, 1993; Ekker et al. 1994). L'extrémité N-terminale de la protéine, qui présente une séquence variable selon les protéines Hox et une structure désordonnée en solution, contacte tant qu'à elle le sillon mineur de l'ADN via des interactions spécifiques avec les bases aux positions un et deux de la séquence consensus mentionnée précédemment (Gehring, 1993; Mann, 1995; Phelan et Featherstone, 1997).

Plusieurs cofacteurs peuvent lier l'extrémité N-terminale des protéines Hox, entre autres d'autres protéines Hox, des protéines homéotiques de la famille Exd et bHLH (Zappavigna et al., 1994; Chang et al., 1995; Knoepfler et al., 1999; Shanmugam et al., 1999). Ils interagissent avec la seule région conservée en N-terminal des protéines Hox, qui est l'homéo peptide (quatre à sept acides aminés, motif YPWM; Chang et al., 1995). Par sa capacité de lier de nombreuses protéines, l'extrémité N-terminale modulerait la transcription induite par les protéines Hox. Les cofacteurs associés aux protéines Hox inhiberaient ou activeraient leurs capacités transcriptionnelles (Calvo et al., 1999; Galant et al., 2002).

1.4.4 Expression des gènes *Hox*

Lors du développement des vertébrés, les RA exercent une importante régulation de l'expression génique en tant que morphogènes naturels (Marshall et al. 1996; Malpel et al., 2000). Ils causent une forte activation de la transcription des gènes situés en 3' des complexes de gènes *Hox* via la liaison du dimère RAR/RXR sur des RARE (Langston et al., 1997). Les gènes situés en 3' des complexes sont les premiers et les plus fortement

exprimés (Prince, 2002; Roelen et al., 2002). Ensuite, les protéines HOX activent l'expression des gènes *Hox* qui sont situés davantage en 5' des complexes, provoquant une expression en cascade de tous les gènes *HOX* contenus dans les complexes (Ogura et Evans, 1995). Via cette régulation en trans de l'expression des gènes *Hox*, les gènes situés en 3' des complexes sont toujours plus fortement exprimés que les gènes en 5' des complexes, et ce, malgré la présence de RARE à l'intérieur des complexes (Mark et al., 1997; Packer et al., 1998). Ces RARE seraient responsables de l'expression temporaire des protéines HOX, qui requièrent une auto-régulation pour être soutenue (Packer et al., 1998). L'expression des gènes *Hox* induite par les RA est donc colinéaire dans le temps (en fonction de la production des différentes protéines Hox) et manifeste également une sensibilité colinéaire à l'activation par les RA (Lufkin, 1997).

En plus d'être sujette à une autorégulation et une régulation dite en cascade effectuée par les autres protéines homéotiques de classe I incluses dans chaque complexe, l'expression des gènes *Hox* dans les différents complexes est soumise à une régulation médiée par des facteurs de transcription comprenant des protéines Hox des autres complexes de gènes homéotiques de classe I, Krox20, Pbx et des récepteurs stéroïdiens-thyroïdiens autres que RAR et RXR incluant les récepteurs de la vitamine D, de l'œstrogène et de la progestérone (Hodgkinson et al., 1993; Di Rocco et al., 1997; Lufkin, 1997; Kim et al., 1998; Taylor et al., 1998; Yau et al., 2002). Ces facteurs causent l'expression persistante des gènes *HOX* dans différents organes et lors de processus normaux de renouvellement cellulaire chez l'Homme (Cillo, 1994; Taylor, 2000;

Thorsteinsdottir et al., 1997; Lenny et al., 1997). Aussi, les composantes de la matrice extracellulaire sont des facteurs de régulation environnementaux de l'expression des gènes *HOX* chez les glandes mammaires humaines (Srebrow et al., 1998).

1.4.5 Implications des protéines Hox dans l'oncogenèse

L'expression des gènes *Hox* lors du développement est médiée par les RA via les récepteurs nucléaires RAR et RXR (Langston et al., 1997). Lorsque l'expression des récepteurs nucléaires RAR est modifiée, elle peut donc affecter directement l'expression des gènes *Hox*, d'où l'intérêt de l'étude des variations d'expression des gènes *Hox* du groupe A en fonction de l'altération de l'expression des récepteurs nucléaires RAR β .

Les protéines Hox sont reconnues pour leur participation à l'organogenèse, à la formation de l'axe antéro-postérieur dans l'embryon, à l'établissement de l'identité cellulaire, au contrôle de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose cellulaire et à l'angiogenèse. La dérégulation de leur expression peut donc transformer le phénotype d'une cellule normale en celui d'une cellule cancéreuse (Rosen et al., 1996; Soncin et al., 1999; Su et al., 2001). D'ailleurs, l'expression des gènes *HOX* est aberrante dans les tumeurs de plusieurs types de cancers humains, dont les cancers pulmonaires (De Vita et al., 1993; Tiberio et al., 1994; Cillo, 1994; Flagiello et al., 1997; Vider et al., 2000; Lechner et al., 2002). Des augmentations ou des diminutions de l'expression ainsi qu'une expression ectopique des gènes *HOX* peuvent être observées. Il a été proposé que leur patron d'expression dans les cancers pulmonaires recrée partiellement le patron

d'expression retrouvé dans les poumons embryonnaires (Lecher et al., 2002). De plus, les complexes de gènes *HOX* seraient des sites privilégiés de méthylation chez les adénocarcinomes pulmonaires (Shiraishi et al., 2002). En général, la méthylation exerce une régulation négative de l'expression génique qui pourrait influencer directement l'expression des gènes *HOX* chez les cellules humaines.

Chez plusieurs lignées cellulaires hématopoïétiques, le patron d'expression des gènes *Hox* varie au cours des différents stades d'évolution leucémiques (Magli et al., 1991; Celetti et al., 1993). L'expression anormale des gènes *HOX* pourrait ainsi mener à une prolifération cellulaire inhabituelle et au développement des maladies pulmonaires (Maulbecker et Gruss, 1993; Cillo et al., 1999; Golpon et al., 2001). La sur-expression subséquente de *Hoxa-1*, *Hoxa-5*, *Hoxa-7* et *Hoxa-9* dans des fibroblastes a provoqué la transformation des fibroblastes en cellules immortelles, ce qui démontre directement le caractère oncogénique des protéines Hox (Maulbecker et Gruss, 1993).

Chez l'humain, les protéines HOX modulent l'expression de protéines contrôlant la prolifération cellulaire, telles p53 et p21^{waf/cip1} (Jacks et Weinberg, 1998; Osada et Takahashi, 2002). Par exemple, la protéine HOXA-5 module l'expression de la protéine p53 (Raman et al. 2000). Lorsque p53 est absent de la cellule, les mutations s'accumulent dans l'ADN, ce qui favorise l'oncogenèse (Sharpless et DePinho, 2002). Aussi, l'expression de p21^{waf/cip1}, un régulateur important du cycle cellaire et un facteur de différenciation cellulaire, serait sous le contrôle de la protéine HOXA-10 (Bromleigh et

Freedman, 2000). Chez des souris avec le gène de $p21^{waf/cip1}$ invalidé, l'absence de $p21^{waf/cip1}$ provoque une oncogenèse pulmonaire prématurée et une plus forte tendance à former des tumeurs multiples (Jackson et al., 2002). Lorsque l'expression d'HOXA-10 est diminuée chez les cellules cancéreuses, la protéine $p21^{waf/cip1}$ peut être exprimée anormalement, ce qui conduit les cellules à proliférer davantage et à se dé-différencier progressivement. Ces conditions cellulaires sont parfaites pour le développement des tumeurs. Considérant tous ces faits, les gènes homéotiques exprimés de façon aberrante sont des candidats dans l'oncogenèse.

2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Les récepteurs nucléaires RAR β , souvent délétés dans les cancers du poumon, contrôlent plusieurs processus cellulaires majeurs tels que la différenciation, l'apoptose et la prolifération. Ils modulent l'expression des gènes HOX, qui sont également impliqués de façon importante dans le contrôle des processus cellulaires. De plus, ils régissent l'expression d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs, intimement liés à l'oncogenèse. Les différents isoformes du récepteur nucléaire RAR β ont été impliqués clairement dans l'oncogenèse pulmonaire chez des souris transgéniques sur-exprimant l'isoforme RAR β 4 ou sous-exprimant les isoformes RAR β 1, RAR β 2 ou RAR β 3. Le gène RAR β est donc un gène suppresseur impliqué dans l'oncogenèse pulmonaire.

Considérant que les gènes *Hox* sont des gènes cibles des RAR et des RXR, mon projet de recherche a pour but de vérifier l'expression des gènes du complexe Hoxa chez les souris transgéniques présentant des modifications d'expression des différents isoformes de RAR β . Pour ce faire, j'ai entrepris une étude des variations d'expression des gènes homéotiques dans les tissus pulmonaires par immunofluorescence et analyse d'images obtenues par microscopie confocale. Ensuite, j'ai vérifié par immunobuvardage l'expression de la protéine Hoxa-5 chez les pneumocytes de type II.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Les souris transgéniques

3.1.1 Les différentes lignées transgéniques

Les tissus pulmonaires utilisés pour les coupes histologiques et les extraits protéiques proviennent de sept lignées de souris transgéniques produites par le Dr Jacques Bérard à partir de trois constructions différentes (Bérard et al. 1994; Bérard et al. 1996; Bérard et al. 1997). Ces souris transgéniques ont été générées afin de moduler l'expression des isoformes de RAR β . Les lignées transgéniques 1002 et 1003 portent le transgène AS-RAR β 1/ β 3, les lignées transgéniques 422, 426 et 432 portent le transgène AS-RAR β 2 et les lignées 32 et 5005 portent le transgène RAR β 4-LIKE. Chaque lignée exprime le transgène à un niveau particulier, ce qui module différemment l'expression des isoformes de RAR β .

3.1.2 Identification des souris transgéniques

Pour reproduire les lignées de souris transgéniques, nous croisons une souris hétérozygote pour le transgène avec une souris non transgénique. Ceci permet d'obtenir des portées dont la moitié des souris portent un allèle contenant le transgène. Il est essentiel de génotyper chacun des souriceaux afin de départager les souris transgéniques des souris contrôles. Pour ce faire, un prélèvement sanguin au niveau du sinus orbital a été fait. L'ADN génomique servant à l'amplification spécifique de la région du transgène par PCR a été extrait selon le protocole du Kit Dr GenTLE (TAKARA, Fisher Scientific,

Pittsburgh, PA, USA) ou selon une adaptation du protocole du DNAzol Reagent (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada).

L'extraction de l'ADN génomique avec le kit du Dr GenTLE est amorcée avec l'ajout de 200 µl de sang dans 1 000 µl de solution I (une solution de lyse cellulaire brevetée et de composition secrète, contenant probablement du SDS et de la protéinase K). La solution obtenue est agitée à l'aide d'un vortex immédiatement pendant 20 secondes. Ensuite, elle est incubée pendant dix minutes à la température de la pièce. Après une centrifugation de cinq minutes à 13 000 rpm, le surnageant est retiré et remplacé par 1.3 ml de solution II (une solution de lavage brevetée et de composition secrète, contenant probablement un alcool). La solution II et l'ADN sont mélangés et centrifugés deux minutes à 13 000 rpm. Le surnageant est retiré et 1.0 ml de la solution III (une solution de dissolution de l'ADN brevetée et secrète, contenant probablement du tampon Tris (pH 8.0)) est placé dans le tube. Le contenu du tube est vortexé pendant 10 secondes, puis centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant, qui contient l'ADN génomique de souris, est transféré dans deux tubes stériles. L'ADN est précipité par l'addition d'un dixième du volume total de la solution d'ADN génomique d'acétate de sodium 3 M et de 500 µl d'isopropanol 100 %, suivi d'une incubation de 15 minutes à – 20°C. Après une centrifugation de 10 minutes à 13 000 rpm, le culot d'ADN génomique est lavé avec 200 µl d'éthanol 70% suivi de 200 µl d'éthanol 95%. Finalement, il est séché à l'air libre et ré-hydraté dans 20 µl d'eau distillée stérile. L'extraction de l'ADN génomique de souris avec le kit du Dr GenTLE est difficile à suivre visuellement, et

souvent, doit être refaite plusieurs fois car le culot d'ADN génomique instable est aspiré lors du retrait de la solution I mélangée avec les composantes du sang des souris.

Pour faciliter l'isolation de l'ADN génomique des souris transgéniques, une modification du protocole d'isolation de l'ADN génomique tissulaire employant le «DNAzole Reagent» a été mise au point. L'extraction d'ADN génomique de souris est accomplie en plaçant 200 µl de sang dans 1.0 ml de DNAzol Reagent. La solution obtenue est inversée trois fois et mise sur glace jusqu'à l'ajout de 500 µl d'éthanol 100 %. Le tube est vortexé, puis placé pendant 20 minutes à -20°C . Après une centrifugation de 15 minutes à 13 000 rpm, le culot d'ADN génomique est ré-hydraté dans 300 µl de NaOH 8 mM. Le tube est vortexé, puis placé pendant 15 minutes à 37°C pour favoriser la solubilisation de l'ADN. Une centrifugation de huit minutes à 13 000 rpm permet de séparer les matières insolubles de la solution d'ADN génomique: le culot obtenu est jeté. Ensuite, un volume égal de phénol-chloroforme est ajouté à la solution d'ADN génomique pour la nettoyer des traces résiduelles de DNAzol ou de protéines. Ensuite, l'ADN est précipité par l'ajout d'un dixième du volume de la solution d'ADN génomique d'acétate de sodium 3 M et de 2.5 fois le volume de l'échantillon d'éthanol 100 %, suivi d'une incubation de 15 minutes à -20°C . Après une centrifugation de 15 minutes à 13 000 rpm, le culot d'ADN génomique est lavé une dernière fois avec 200 µl d'éthanol 70 % et séché à l'air libre. L'ADN est ré-hydraté dans 20 µl de NaOH 8 mM.

La présence du transgène dans les souris transgéniques est confirmée par amplification par PCR. Chaque réaction PCR comprend 10 µl d'ADN génomique en

solution, 2 µl de dNTP 10 mM (0.2 mM), 0.4 µl de Taq ADN polymérase (0.8 U, Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada), 10 µl de tampon de réaction 10 X fourni avec la Taq ADN polymérase (Tris-HCl 100 mM, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3), 75.6 µl d'eau distillée stérile, 1 µl (100 pmoles) d'oligonucléotide 5'-CTCAGGTCGGCCGACTGCGG-3' (qui s'hybride avec le promoteur MMTV) et 1 µl (100 pmoles) d'un des trois oligonucléotides suivant : RARβ1/β3 5'-GAGCACTGGTCCTTCAGTGAAGCCTGAAGC-3' (Bérard et al., 1997); RARβ2 5'-GCTAGCAGTATGCCGGTGCTGCCAT-3' (Bérard et al., 1996) ou RARβ4 5'-GACGAGCTCAGAGCTGGTACTCTGTGT-3' (Bérard et al., 1994). De plus, 50 µl de N-dodécane sont ajoutés sur la réaction PCR dans le but d'empêcher l'évaporation du mélange réactionnel. Les conditions PCR utilisées sont : une dénaturation primaire de 94°C / 3 minutes, suivie de 35 cycles de 94°C / 1 minute, 57°C / 1 minute, 72°C / 1 minute. Les fragments d'ADN produits correspondent à la portion d'ADN du transgène amplifiée par PCR et comprise entre les deux oligonucléotides. Leur longueur est d'environ 250 nucléotides (nt). Les produits de la réaction PCR sont séparés sur un gel d'agarose de 2 % contenant une concentration de 5 µg/ml de bromure d'éthidium. La migration est effectuée à 110 volts dans du tampon TAE 1X. Les souris sont transgéniques lorsque la bande d'ADN de 250 nt apparaît dans le gel placé sous les rayons ultraviolets dans un appareil de type Alpha ImagerTM 1200.

3.2 Observations des variations d'expression des gènes *Hox* du groupe A dans les modèles animaux

3.2.1 Évaluation histologique des poumons

Les variations d'expression des gènes *Hox* du groupe A ont été analysées dans les poumons de souris transgéniques et non transgéniques. Une autopsie a été pratiquée sur des souris âgées de 14 mois et plus pour prélever les poumons. Les échantillons de poumons ont été fixés dans du Bouin (composé d'acide picrique saturé, de formaldéhyde 37 % et d'acide acétique glacial mélangés dans des proportions de 15 : 5 : 1) à 22°C pendant 24 heures. Par la suite, ils ont été mis en bloc de paraffine selon les méthodes conventionnelles. Des coupes histologiques de poumons ont été préparées pour une évaluation plus poussée. Les blocs de paraffine contenant les poumons de souris ont été sectionnés en coupe de 5 µm avec un microtome (Spencer). Les coupes de poumons ont été déposées sur des lames silanisées, selon la technique conventionnelle. Un tissu de poumon non transgénique a été mis en parallèle aux tissus pulmonaires des lignées de souris porteuses des constructions AS-RARβ2, AS-RARβ1/β3 et RARβ4-LIKE sur chaque lame analysée.

Pour confirmer la présence de tumeurs pulmonaires, les coupes de poumons sont d'abord déparaffinées et colorées à l'éosine / hématoxyline selon le protocole suivant : 3 x 2 minutes dans le toluène 100 %, 3 x 2 minutes dans l'éthanol 100 %, 5 minutes dans l'eau distillée, 5 minutes dans l'hématoxyline Harris (5.0 g de cristaux d'hématoxyline,

100.0 g d'alun de potassium, 2,5 g d'oxyde mercurique, 50.0 ml d'éthanol glacial et de l'eau distillée pour atteindre un volume de 1 000.0 ml), 5 minutes dans l'eau distillée, 10 immersions dans une solution d'éthanol 70 % contenant 1 % d'acide chlorhydrique 33-40 % (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), 2 minutes dans l'eau distillée, 2 x 2 minutes dans l'éthanol 100 %, 2 minutes dans une solution d'éosine Y (solution stock de 1.0 g dilué dans 100.0 ml d'éthanol 80 % diluée dans une proportion 1 :3 dans l'éthanol 80 %), 10 immersions dans l'éthanol 100 %, 2 x 2 minutes dans l'éthanol 100 %, 3 x 2 minutes dans du toluène 100 %. Le séchage des lames a été effectué à la température de la pièce, puis les lames ont été montées avec un milieu de montage placé directement sur le tissu. Les colorations ont été observées en microscopie optique pour révéler la présence ou l'absence de tumeurs pulmonaires.

3.2.2 Technique d'immunofluorescence

Les poumons ont été fixés dans du Bouin pendant 24 heures, déshydratés, mis en bloc de paraffine, sectionnés en coupes de 5 μ m et placés sur des lames silanisées. Les lames porteuses des sections pulmonaires témoins et transgéniques sont déparaffinées selon le protocole suivant : 3 x 5 minutes dans un bain de toluène 100 %, 3 x 5 minutes dans un bain d'éthanol 100 %, 3 minutes dans des bains d'éthanol de concentration 95, 85, 75, 50 et 30 % respectivement, 10 minutes dans un bain de PBS 1X (pH 7.4), 20 minutes dans un bain de NH_4Cl 50 mM dilué dans du PBS 1X (pH 7.4) et 5 minutes dans un bain de PBS 1X (pH 7.4). Afin de bloquer les sites antigéniques non spécifiques, les sections pulmonaires déparaffinées sont ensuite recouvertes de 400 μ l d'une solution contenant 5 % de lait écrémé en poudre dilué dans le PBS 1X (pH 7.4) pendant 20

minutes à la température de la pièce, puis lavées deux fois pendant 5 minutes dans du PBS 1X (pH 7.4). Les antigènes pulmonaires sont réactivés par deux incubations d'une minute dans une solution de citrate de sodium 10 mM (pH 6.0) chauffée progressivement jusqu'à 98°C suivie de deux rinçages de 5 minutes dans du PBS 1X (pH 7.4). Les lames porteuses des sections pulmonaires déparaffinées et réactivées sont placées dans du PBS 1X (pH 7.4) à 4°C jusqu'au lendemain.

Les protéines Hox sont marquées de façon indirecte, en employant dans un premier temps un anticorps polyclonal spécifique à la protéine ciblée. Les anticorps de lapin polyclonaux utilisés pour observer Hoxa-1, Hoxa-2, Hoxa-4, Hoxa-5 et Hoxa-7 (Covance, Princeton, NJ, USA) sont dilués dans une proportion 1 : 200 dans une solution de PBS 1X (pH 7.4) / BSA 1 %. Un volume de 200 µl de cette solution d'anticorps est réparti sur les sections pulmonaires non transgéniques et transgéniques pendant 120 minutes, dans une chambre humide. Ensuite, deux rinçages dans un bain de PBS 1X (pH 7.4) de 5 minutes sont effectués pour éliminer les anticorps non fixés. Les sections pulmonaires sont par la suite mises en contact avec un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à une molécule FITC (Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville, ON, CANADA), dilué dans une proportion 1 : 100 dans une solution de PBS 1X (pH 7.4) / BSA 1%, pendant 45 minutes dans une chambre noire, fermée et humidifiée. Suite à cette incubation, les sections pulmonaires sont lavées à la noirceur deux fois dans le PBS 1X (pH 7.4) pendant 5 minutes. Les lames sont montées sous lumière tamisée avec l'application d'une lamelle sur une goutte de glycérine Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) déposée juste au-dessus des sections pulmonaires marquées.

La détection du signal d'immunofluorescence des protéines Hoxa-1, Hoxa-2, Hoxa-4, Hoxa-5 et Hoxa-7 marquées de façon indirecte par les anticorps est effectuée sur un microscope confocal muni d'un système de balayage (NORAN Instruments Inc, Middleton, WI, USA) équipé avec un rayon laser au krypton et à l'argon et couplé à un microscope inversé possédant un objectif adapté à l'huile d'immersion 40X (Nikon). Les molécules FITC associées aux anticorps secondaires présents sur les sections pulmonaires marquées sont excitées à 488 nm. La lumière émise par les molécules de FITC est mesurée à une longueur d'onde de 525 nm. Les sections optiques sont recueillies à tous les 25 μ m, avec un diamètre d'ouverture de 15 μ m du diaphragme qui limite l'entrée de la lumière dans l'objectif. Les images digitalisées sont obtenues grâce au logiciel Intervision 2D sur une station de travail Silicon Graphics O2 (NORAN Instruments Inc, Middleton, WI, USA). Les valeurs PMT (tube photomultiplicateur) sont gardées constantes afin de pouvoir comparer les résultats des coupes provenant de souris transgéniques avec celles provenant de souris non transgéniques. De plus, les coupes de poumons de souris transgéniques et non transgéniques sont disposées sur la même lame afin d'être analysés dans les mêmes conditions expérimentales. Les pneumocytes de type II et les cellules de Clara et les cellules cancéreuses ont été différenciés des autres types cellulaires pulmonaires respectivement par leur tendance à se regrouper, leur localisation, ainsi que par leur forme. Les images retrouvées dans la section résultats sont représentatives des résultats obtenus. Pour rendre plus facile la comparaison visuelle entre les images, une échelle pseudo-colorée indique l'intensité du signal immunofluorescent pour chaque figure. Toutes les valeurs obtenues ont été traitées statistiquement avec le logiciel Excel

de Microsoft Office 2000. Les études statistiques ont été réalisées par le test de Student non pairé à une direction. Elles sont représentées graphiquement par une moyenne accompagnée de l'écart-type (E. T.). La différence statistique d'une donnée d'avec celle obtenue pour les cellules non-transgéniques contrôles a été fixée à 95 % ($p < 0.05$).

3.3 Immunobuvardage

3.3.1 Isolement et purification des pneumocytes de type II transgéniques et non-transgéniques

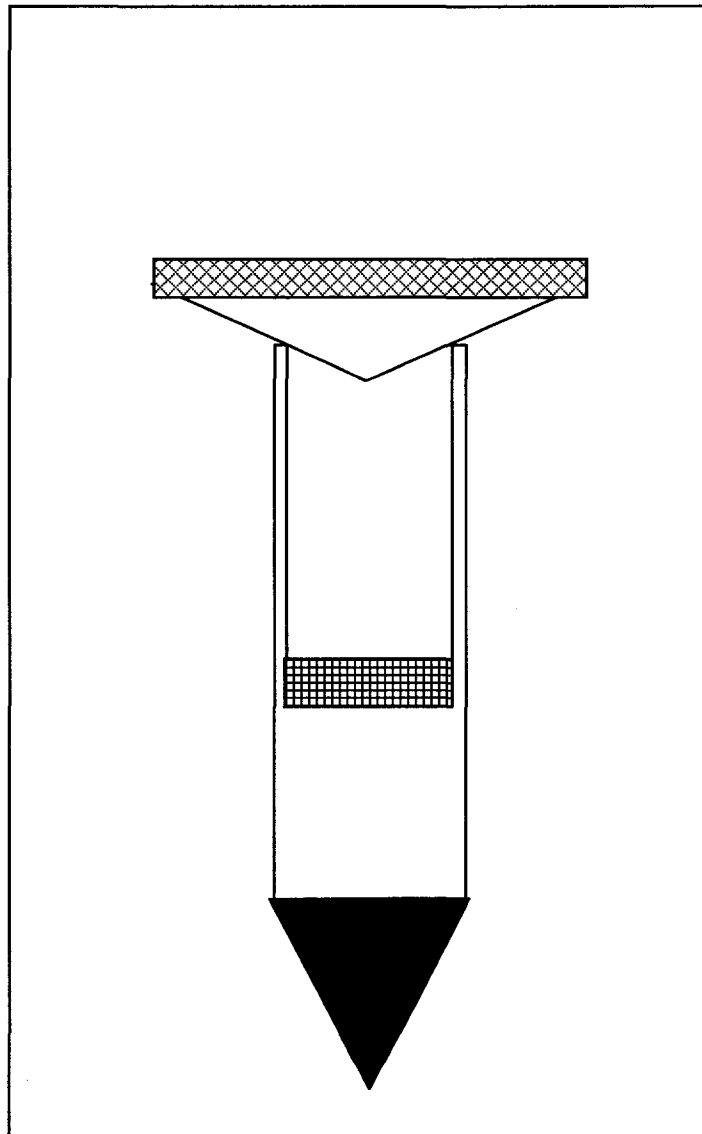
Les pneumocytes de type II ont été isolés des poumons pour préparer les extraits de protéines requis pour analyser l'expression des protéines Hoxa par immunobuvardage. La technique d'extraction des pneumocytes de type II à partir des poumons de souris transgéniques a été accomplie selon une version adaptée du protocole établi par l'équipe de Corti (Corti *et al.*, 1996). Suite à une trachéotomie, deux injections de 1.0 ml d'un mélange constitué de 5.0 ml de dispase (Becton Dickinson and Co. (Collaborative Research), Franklin Lakes, NJ, USA), de 500 µl de désoxyribonucléase I (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) d'une concentration de 5 mg / ml dissoute dans le tampon de réhydratation recommandé (50 % glycérol, 5 mM NaAC, 1 mM CaCl₂) et de 900 µl de tampon de réaction de la désoxyribonucléase I (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 50 ug / ml BSA; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) sont effectuées dans le poumon via un cathéter à un intervalle d'une minute. Ensuite, 1.0 ml d'agarose «Low Melting Point» 1 % fondu (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) est introduit dans le poumon via ce même cathéter. Les poumons, remplis de dispase et d'agarose, sont ensuite incubés à 35°C pendant 45 à 60 minutes dans les 3.0 ml de solution enzymatique de dispase non utilisés. Par la suite, les poumons sont désagregés mécaniquement avec un ciseau chirurgical stérilisé dans 4.0 ml de DMEM (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) sans sodium pyruvate, contenant 4.500 m g / L de D-glucose, de la L-glutamine, du

tampon HEPES 25 mM (pH 7.0) et 400 µl de désoxyribonucléase I à une concentration de 5 mg / ml (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada). La solution cellulaire obtenue est ensuite filtrée successivement sur des filtres en tissu dont les pores ont une dimension respective de 100 et de 25 µm (figure 8; Sephar Inc. Ville St-Laurent, QC, Canada). Afin de concentrer les cellules pulmonaires en culot, le filtrat obtenu est centrifugé pendant 8 minutes à 800 rpm. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans un volume de 5.0 ml de DMEM. Un aliquot de 20 µl du filtrat constituant la suspension cellulaire totale est prélevé et coloré avec une solution de bleu de Trypan 0.8 %. À l'aide d'un hémacimètre, les cellules isolées sont alors dénombrées.

Dans la suspension cellulaire totale, plusieurs cellules associées au système immunitaire pulmonaire sont présentes. Pour isoler les pneumocytes de type II de ces cellules indésirables, le système MACS^{LS-} a été sélectionné pour effectuer une sélection négative des pneumocytes de type II (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Après une centrifugation de 8 min à 800 rpm de la suspension cellulaire totale, le culot de cellules pulmonaires est resuspendu à raison de dix millions de cellules dans un volume de 90 µl de PBS 1X / BSA 0.5 % (pH 7.2). Par la suite, les anticorps monoclonaux de rat IgG2b anti-CD45 couplés à une bille magnétique (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) sont ajoutés à la suspension cellulaire totale dans une proportion de 10 µl d'anticorps pour 10 millions de cellules. Ces anticorps lient les cellules du système immunitaire (Ledbetter et Herzenberg, 1979; Ewijk et al., 1981) et permettent de les séparer de la suspension cellulaire totale. Après une incubation de 15 minutes à 4°C, 10.0 ml de PBS 1X / BSA 0.5 % (pH 7.2) sont ajoutés à la suspension de cellules pour diluer les anticorps non liés. Les

Figure 8. Montage de filtration de la suspension cellulaire totale

La suspension cellulaire totale a été filtrée sur un montage stérile composé d'un entonnoir recouvert du filtre aux pores de 150 μm inséré dans un tube dont l'embouchure était recouverte du filtre de 25 μm . Ce montage évite deux manipulations des cellules pulmonaires primaires, ce qui favorise leur survie suite à leur détachement de la matrice extracellulaire.



cellules pulmonaires sont ensuite concentrées à nouveau par une centrifugation effectuée pendant 8 min à 800 rpm. Le culot cellulaire obtenu est suspendu dans 1.0 ml de PBS 1X / BSA 0.5 % (pH 7.2). La suspension cellulaire est alors placée sur une colonne ^{LS-} (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) pré-conditionnée avec 1.0 ml de PBS 1X / BSA 0.5 % (pH 7.2) et soumise à un fort champ magnétique. Les cellules immunitaires pulmonaires restent dans la colonne magnétisée car elles sont liées aux anticorps anti-CD45 couplés aux billes magnétiques. Pour récupérer le maximum de pneumocytes de type II, trois lavages de 1.0 ml de PBS 1X / BSA 0.5 % (pH 7.2) du flacon qui contient la suspension cellulaire mise en présence des anticorps et trois lavages de 3.0 ml de PBS 1X / BSA 0.5 % (pH 7.2) de la colonne sont réalisés. Les pneumocytes de type II semi-purifiés sont concentrés à partir de l'éluat de la colonne par une centrifugation de 8 minutes à 800 rpm. Ensuite, ils sont resuspendus dans un volume de 5.0 ml de DMEM, puis soumis à une purification supplémentaire par adhérence sur un Pétri de culture en plastique durant une heure, dans un incubateur à 37°C, contenant 5 % de CO₂. Cette purification secondaire permet d'éliminer les cellules adhérentes contaminantes pouvant se trouver dans l'éluat cellulaire, tels les fibroblastes et les cellules musculaires lisses.

Selon des analyses cytométriques associées aux marquages cellulaires spécifiques aux pneumocytes de type II (SP-B) et aux cellules de Clara (CC10) obtenues par la technique du FACS, la pureté de la suspension cellulaire a été approximativement déterminée. Lorsque le protocole décrit précédemment utilise 1.0 ml de Dispase, de la glace pour figer l'agarose et une dispersion des cellules par agitation supplémentaire à la dispersion mécanique, la suspension cellulaire finale contient environ 70 % de

pneumocytes de type II, 12 % de cellules de Clara et 10 à 20 % d'autres cellules. Les pneumocytes de type II constituent le type cellulaire majeur contenu dans la suspension cellulaire finale.

3.3.2 Préparation et dosage des échantillons de pneumocytes de type II pour l'immunobuvardage

Afin d'analyser l'expression des protéines Hoxa par immunobuvardage, les pneumocytes de type II isolés ont été lysés dans 300 à 400 µl de tampon Laemmli 1X (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.3 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 10 % glycérol, 0.001% bleu de bromophénol, 5 % 2-β-mercaptoéthanol). Les lysats cellulaires ont ensuite été chauffés à 95°C pendant cinq minutes, soniqués, puis rechauffés à 95°C pendant cinq minutes pour bien séparer les protéines qu'ils contenaient. Les concentrations de protéines totales ont été déterminées par une méthode modifiée de Lowry (Peterson, 1977). Une courbe standard établie avec l'albumine de sérum bovin (BSA) a été effectuée en parallèle avec chaque dosage protéique. Tous les échantillons ont été dosés en duplicata.

3.3.3 Procédé d'immunobuvardage et marquage

Une quantité de 50 µg de protéines totales extraites de pneumocytes de type II (souris transgéniques des lignées 32, 5005 et souris contrôles) dans le tampon Laemmli 1X a été séparée par la méthode SDS-PAGE («SDS-polyacrylamide gel electrophoresis»), avec un marqueur de poids moléculaire allant de 2.5 à 45 kDa («Rainbow™ coloured protein molecular weight markers», Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Ensuite, les protéines ont été transférées par électro-transfert sur une membrane de PVDF (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Pour révéler les bandes protéiques d'intérêt sur la membrane de PVDF, un marquage immunologique indirect jumelé au procédé de révélation par chemiluminescence de l'ensemble commercial «Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting kit (Mouse/Rabbit)» a été utilisé (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Dans un premier temps, les sites de liaison protéiques disponibles sur la membrane de PVDF ont été bloqués par une incubation de la membrane pendant une heure, à la température de la pièce et avec agitation dans 40.0 ml de TBST 1X contenant 5 % de lait écrémé en poudre. Ensuite, le marquage avec l'anticorps primaire polyclonal de souris anti-Hoxa-5 (Covance, Princeton, NJ, USA) a été effectué par une incubation de la membrane dans une solution de 10.0 ml de TBST 1X contenant 5 % lait écrémé en poudre et l'anticorps dilué dans une proportion 1 : 1000 pendant une heure à la température de la pièce, avec agitation. Pour enlever les anticorps non fixés, la membrane a été lavée quatre fois pendant 15 minutes dans 40.0 ml de TBST 1X. Enfin, le marquage de la membrane par l'anticorps secondaire couplé à la peroxidase anti-IgG de lapin 1: 2000 (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada), a été réalisé dans 10.0 ml de TBST 1X contenant 5 % lait écrémé en poudre pendant une heure à la température de la pièce avec agitation, suivi de cinq lavages de 15 minutes dans 40.0 ml de TBST 1X. La révélation par chemiluminescence des protéines marquées indirectement par les anticorps a débuté par une immersion de la membrane pendant une minute dans une solution réactive constituée de 10.0 ml de la solution I et de 10.0 ml de la solution II de l'ensemble commercial «ECLTM» (Amersham Pharmacia Biotech, Baie D'Urfé, QC, Canada). Ces solutions contiennent du luminol, un catalyseur de la réaction et du peroxyde stable

réagissant ensemble pour former un produit chemiluminescent. La membrane a par la suite été époncée pour enlever le surplus de solution réactive, recouverte d'une fine pellicule de plastique et placée dans une cassette de développement. Un film spécialisé dans la détection de la chemiluminescence (HyperfilmTMECLTM, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) a été exposé sur la membrane pendant 5 secondes afin de détecter la lumière générée au niveau des protéines marquées indirectement contre Hoxa-5. La bande protéique spécifique à la protéine Hoxa-5 a un poids d'environ 35 kDa.

4. RÉSULTATS

4.1 Analyse de l'expression des protéines Hox du groupe A dans les souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE

Chez les souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE, l'expression des différents récepteurs nucléaires RAR β est modifiée (Bérard et al., 1994; Bérard et al., 1996; Bérard et al., 1997). Puisque ces récepteurs peuvent intervenir dans l'expression des gènes HOX lors du développement embryonnaire, leur niveau d'expression est susceptible d'affecter directement le niveau d'expression des gènes HOX du groupe A (Langston et al., 1997). L'expression aberrante des gènes HOX a été observée dans plusieurs types de cancers pulmonaires (de Vita et al., 1993; Vider et al., 2000; Tiberio et al., 1994; Cillo, 1994; Flagiello et al., 1997; Lechner et al., 2002) et pourrait être la cause du développement accru de tumeurs pulmonaires noté chez les souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE (Bérard et al., 1994; Bérard et al., 1996; Bérard et al., 1997). Dans les pages suivantes, les résultats de l'étude des variations d'expression des gènes *Hoxa-1*, *Hoxa-2*, *Hoxa-4*, *Hoxa-5* et *Hoxa-7* chez les souris transgéniques des lignées AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE effectuée par immunofluorescence et analyse d'images obtenues par microscopie confocale sont présentés. Les images d'immunofluorescence des pneumocytes de type II, des cellules de Clara et des cellules cancéreuses pulmonaires montrées ont été produites à partir d'un seul tissu provenant d'une souris transgénique d'une lignée AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 ou RAR β 4-LIKE. Elles sont représentatives de l'intensité moyenne du signal

d'immunofluorescence observée lors des expériences. Les pneumocytes de type II, les cellules de Clara et les cellules cancéreuses pulmonaires ont été identifiés par leur tendance à se regrouper, par leur localisation et par leur forme. Par exemple, les pneumocytes de type II ont été repérés par leur forme cuboïde et leur emplacement au niveau des parois (surtout au coin) des alvéoles pulmonaires. Les cellules de Clara ont pour leur part été identifiées d'après leur forme cylindrique et leur arrangement circulaire typique dans l'épithélium bronchique pulmonaire. Enfin, les cellules cancéreuses ont été identifiées par leur présence au sein des tumeurs pulmonaires, elles-mêmes différenciées des foyers lymphocytaires pulmonaires par le regroupement de nombreuses cellules formant des stries, présentant une forme irrégulière ainsi qu'un gros noyau. Également, le marquage minimal des tumeurs observé sous lumière fluorescente a servi à distinguer les tumeurs des foyers lymphocytaires qui sont fortement marqués par les anticorps utilisés lors des expériences effectuées au cours de cette étude. Chaque figure est suivie d'une analyse statistique détaillée de l'intensité du signal d'immunofluorescence au sein des cellules pulmonaires ciblées.

4.1.1 Résultats du marquage contre la protéine Hoxa-1

Le gène *Hoxa-1* est le gène homéotique situé le plus en 3' du complexe A (Apiou et al., 1996; Cillo et al., 1999). L'extrémité 3' de son promoteur comprend un RARE (Dupe et al., 1997). Les récepteurs des RA étant des effecteurs de la signalisation des RA sur les RARE, il est fort possible que la sur-expression du récepteur RAR β 4 ou la diminution de l'expression des isoformes RAR β 1/ β 3 cause une expression aberrante de la protéine Hoxa-1.

4.1.1.1 Lignées RAR β 4-LIKE

L'analyse par microscopie confocale de l'intensité relative du signal d'immunofluorescence montre que la protéine Hoxa-1 n'est pas exprimée normalement dans les cellules pulmonaires de nos souris transgéniques RAR β 4-LIKE. En effet, la sur-expression de RAR β 4 affecte à la hausse l'expression de la protéine Hoxa-1.

Chez les pneumocytes de type II RAR β 4-LIKE, l'intensité du signal d'immunofluorescence augmente par rapport à celle des pneumocytes de type II non transgéniques (figure 9 A, B et C). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire chez les pneumocytes de type II des lignées 32 et 5005 ont donné des valeurs de 116.23 ± 18.31 ($p < 0.05$, $n = 6$) et de 79.79 ± 3.30 ($p > 0.05$, $n = 2$) par rapport à la valeur de 62.98 ± 15.26 ($n = 4$) pour les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 10 A). L'intensité du signal d'immunofluorescence augmente donc de 84 % pour la lignée 32 et est non différente pour la lignée 5005 par rapport aux pneumocytes non transgéniques.

Chez les cellules de Clara transgéniques RAR β 4-LIKE, l'intensité du signal d'immunofluorescence est également plus forte que chez les cellules de Clara non transgéniques (figure 9 D, E et F). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaires ont donné des résultats de 106.69 ± 13.24 ($p < 0.05$, $n = 4$) pour les cellules de Clara de la lignée 32, de 95.52 ± 4.16 ($p < 0.001$, $n = 4$) pour la lignée 5005 et de 37.35 ± 4.01 ($n = 4$) pour les cellules de Clara non transgéniques (figure 10 B). Par rapport aux cellules de Clara non transgéniques, l'intensité du signal

d'immunofluorescence augmente donc de 186 % et de 156 % respectivement pour les cellules de Clara des lignées 32 et 5005.

Au sein des cellules cancéreuses RAR β 4-LIKE, l'intensité du signal d'immunofluorescence varie beaucoup et montre une différence entre les deux lignées (figure 9 E et F). L'intensité du signal d'immunofluorescence est de 79.85 ± 5.13 (n = 10) chez les cellules cancéreuses de la lignée 32 et de 29.97 ± 3.63 (n = 10) chez les cellules cancéreuses de la lignée 5005 (figure 10). Par rapport à l'intensité du signal des pneumocytes de type II non transgéniques (de 62.98 ± 15.26 , n = 4), l'intensité du signal d'immunofluorescence dans les cellules cancéreuses des lignées 32 et 5005 n'est pas différente (figure 10 A). Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara non transgéniques (de 37.35 ± 4.01 , n = 4), l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses de la lignée 32 est supérieure de 114 % (p < 0.001), alors que celle de la lignée 5005 est inférieure de 20 % (p < 0.05; figure 10 B).

Figure 9. Variations d'expression de Hoxa-1 chez les souris transgéniques RAR β 4-LIKE

L'anticorps anti-Hoxa-1 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence dans les cellules pulmonaires des souris transgéniques des lignées 32 (B, E et G) et 5005 (C, F et H) en parallèle à celles des souris non transgéniques (A et D). Les cellules pulmonaires observées plus particulièrement sont les pneumocytes de type II (A, B et C), les cellules de Clara (D, E et F) et les cellules tumorales pulmonaires (G et H) provenant d'une même souris transgénique. L'intensité du signal d'immunofluorescence est indiquée par l'échelle pseudo-colorée située à droite de la figure qui va de 0 à 255 (visuellement, du noir vers le blanc). L'échelle de taille dans les panneaux A à H correspond à 10 μ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.

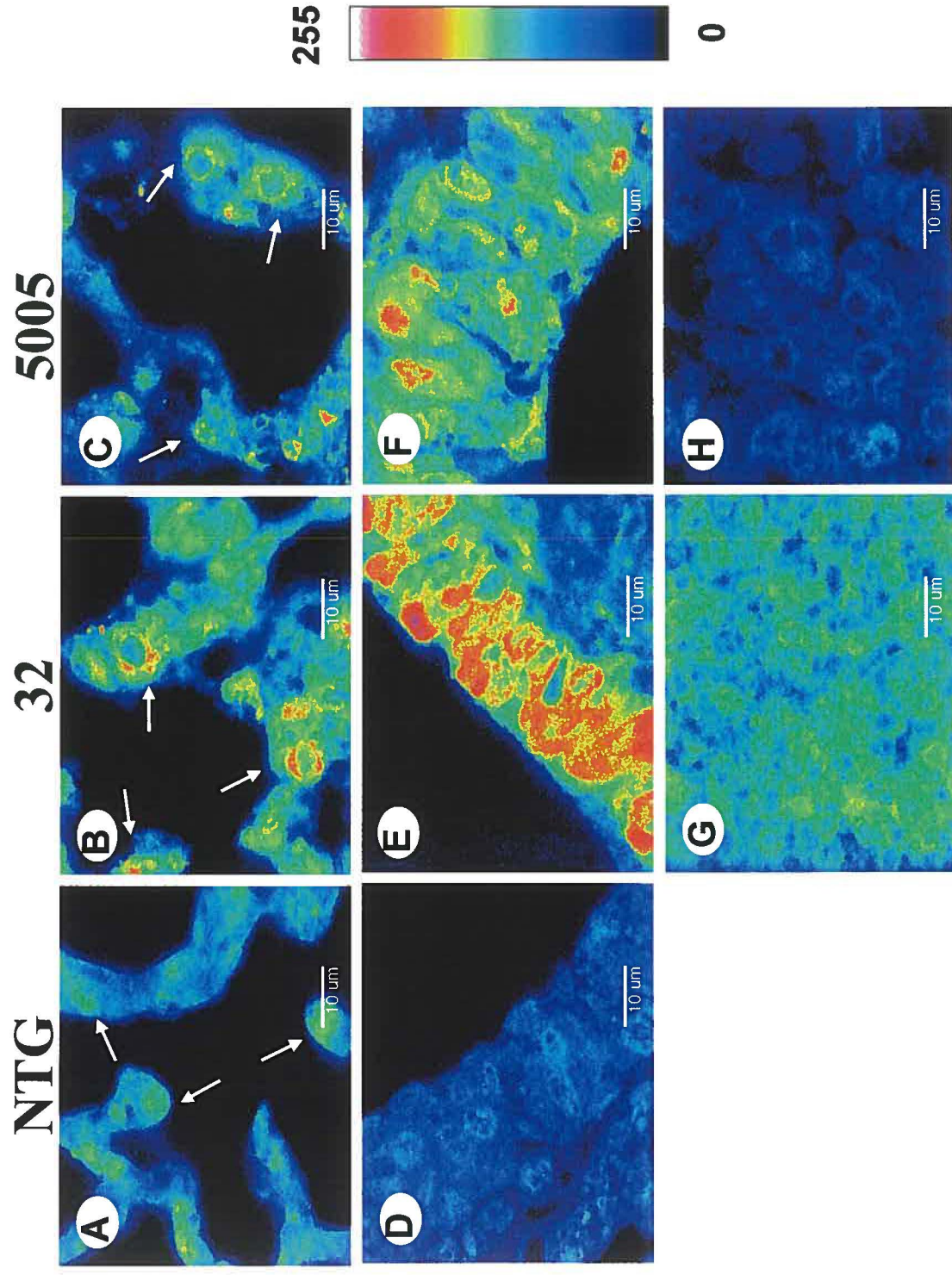
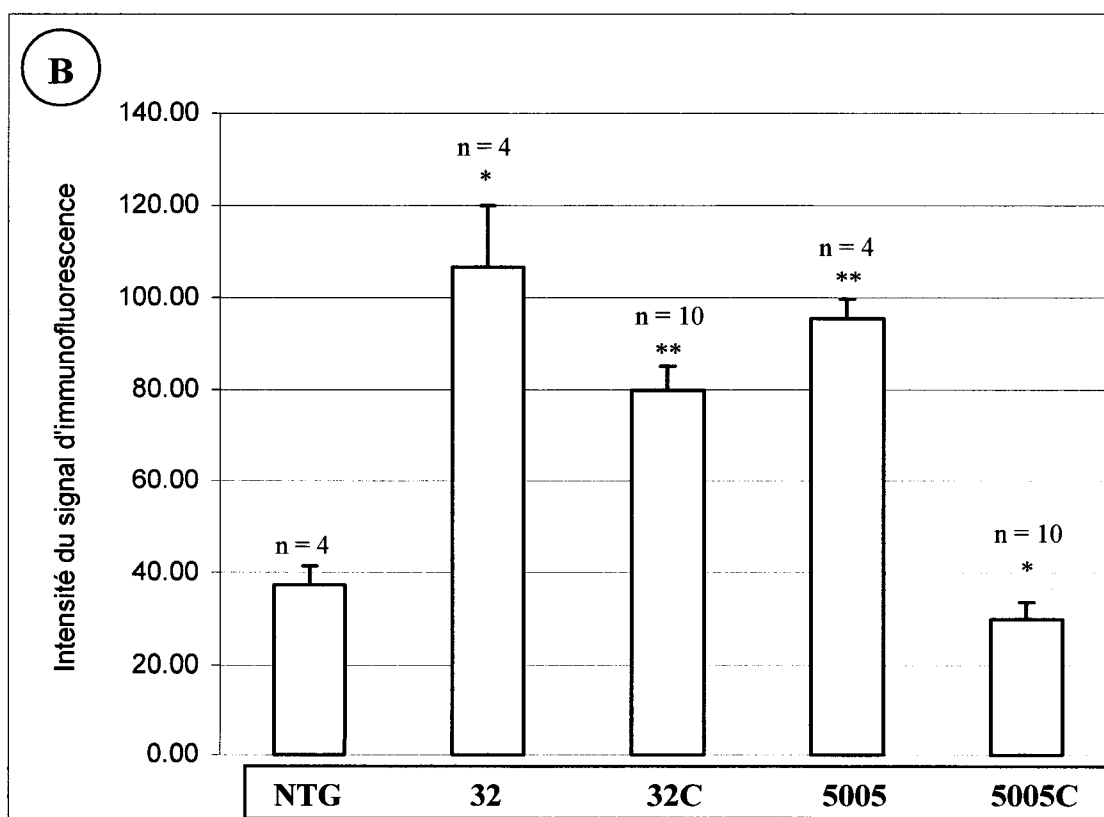
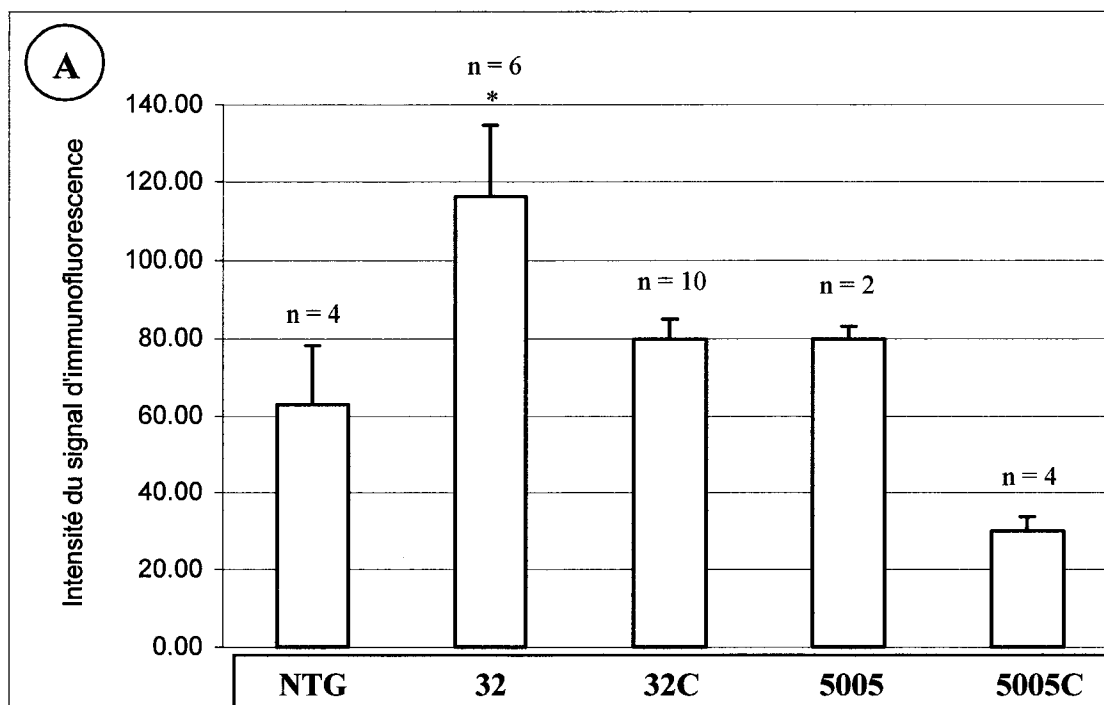


Figure 10. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-1 chez les cellules RAR β 4-LIKE

L'intensité du signal d'immunofluorescence observé chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara a été mesurée par analyse des images obtenues par microscopie confocale avec le logiciel Intervision, version Unix. Ces mesures sont représentées graphiquement par la moyenne établie sur une population de cellules. Une barre d'erreur est indiquée au-dessus des colonnes. Les graphiques regroupent les lignées porteuses de la construction RAR β 4-LIKE. Sur le graphique A, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les pneumocytes de type II non transgéniques et chez les pneumocytes de type II transgéniques non cancéreux (respectivement 32 et 5005) et cancéreux (respectivement 32C et 5005C) est présentée. Sur le graphique B, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules de Clara non transgéniques et chez les cellules de Clara transgéniques non cancéreuses (respectivement 32 et 5005) et cancéreuses (respectivement 32C et 5005C) est exposée. Les symboles * et ** indiquent respectivement une différence significative ($p < 0.05$) et une différence très significative ($p < 0.001$) entre la valeur obtenue chez les cellules contrôles et celles obtenues chez les cellules transgéniques.



4.1.2 Résultats du marquage contre la protéine Hoxa-2

Dans la littérature, la protéine Hoxa-1 est impliquée dans l'expression en cascade des gènes du complexe Hox A qui comprennent le gène codant pour la protéine Hoxa-2 (Ogura et Evans, 1995). De plus, Dupe et al. ont rapporté que le RARE situé en 3' du gène *Hoxa-1* est essentiel pour l'expression correcte du gène *Hoxa-2* lors du développement (Dupe et al., 1997). Compte tenu de ces faits, nous croyons que l'expression de la protéine Hoxa-2 pourrait être modifiée dans les cellules de nos souris transgéniques porteuses des altérations d'expression de RAR β causées par les transgènes AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE.

4.1.2.1 Lignées AS-RAR β 1/ β 3

L'analyse par microscopie confocale de l'intensité relative du signal d'immunofluorescence d'Hoxa-2 montre que l'expression de cette protéine varie chez nos souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3. Chez ces souris, la sous-expression des récepteurs RAR β 1 et RAR β 3 affecte à la hausse l'expression de la protéine Hoxa-2.

Chez les pneumocytes de type II des lignées AS-RAR β 1/ β 3, l'intensité du signal d'immunofluorescence tend à augmenter par rapport aux pneumocytes de type II non transgéniques (figure 11 A, B et C). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire chez les pneumocytes de type II des lignées 1002 et 1003 ont donné des valeurs de 64.99 ± 12.82 ($p < 0.05$, $n = 20$) et de 122.71 ± 15.46 ($p < 0.0001$, $n = 19$) par rapport à la valeur de 72.03 ± 9.93 ($n = 20$) pour les pneumocytes de

type II non transgéniques (figure 12 A). Par rapport aux pneumocytes de type II non transgéniques, l'intensité du signal d'immunofluorescence diminue donc de 10 % chez les pneumocytes de type II de la lignée 1002 et augmente de 70 % chez les pneumocytes de type II de la lignée 1003. La diminution significative du signal d'immunofluorescence chez les pneumocytes de type II de la lignée 1002 est douteuse car l'E. T associé à ces cellules chevauche celui associé aux pneumocytes de type II non transgéniques.

Chez les cellules de Clara transgéniques AS-RAR β 1/ β 3, l'intensité du signal d'immunofluorescence augmente par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence observée chez les cellules de Clara non transgéniques (figure 11 D, E et F). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire chez les cellules de Clara des lignées 1002 et 1003 ont donné des valeurs de 44.39 ± 3.29 ($p < 0.0001$, $n = 12$) et de 62.02 ± 4.18 ($p < 0.0001$, $n = 12$) par rapport à la valeur de 32.22 ± 4.58 ($n = 12$) pour les cellules de Clara non transgéniques (figure 12 B). Donc, l'intensité du signal augmente respectivement de 38 % chez les cellules de Clara de la lignée 1002 et de 92 % chez les cellules de Clara de la lignée 1003 par rapport aux cellules de Clara non transgéniques.

Chez les cellules cancéreuses AS-RAR β 1/ β 3, le signal d'immunofluorescence contre la protéine Hoxa-2 varie beaucoup et montre une différence entre les deux lignées (figure 11, E et F). L'intensité du signal d'immunofluorescence calculée est de 32.75 ± 7.35 ($n = 15$) pour les cellules cancéreuses de la lignée 1002 et de 84.64 ± 27.23 ($n = 15$) pour la lignée 1003 (figure 12). Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence

des pneumocytes de type II non transgéniques (de 72.03 ± 9.93 , $n = 20$), l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses de la lignée 1002 est inférieure de 55 % ($p < 0.0001$; figure 12 A), alors que celle des cellules cancéreuses de la lignée 1003 n'est pas différente. Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara non-transgéniques (de 32.22 ± 4.58 , $n = 12$), l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules cancéreuses de la lignée 1002 n'est pas différente, alors que celle de la 1003 est supérieure de 163 % ($p < 0.0001$; figure 12 B).

Figure 11. Variations d'expression de Hoxa-2 chez les souris transgéniques

RAR β 1/ β 3

L'anticorps anti-Hoxa-2 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules pulmonaires des souris transgéniques des lignées 1002 (B, E et G) et 1003 (C, F et H) en parallèle à celles des souris non-transgéniques (A et D). Les cellules pulmonaires observées plus particulièrement sont les pneumocytes de type II (A, B et C), les cellules de Clara (D, E et F) et les cellules tumorales pulmonaires (G et H) provenant d'une même souris transgénique. L'intensité du signal d'immunofluorescence est indiquée par l'échelle pseudo-colorée située à droite de la figure et qui va de 0 à 255 (visuellement, du noir vers le blanc). L'échelle de taille dans les panneaux A à H correspond à 10 μ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.

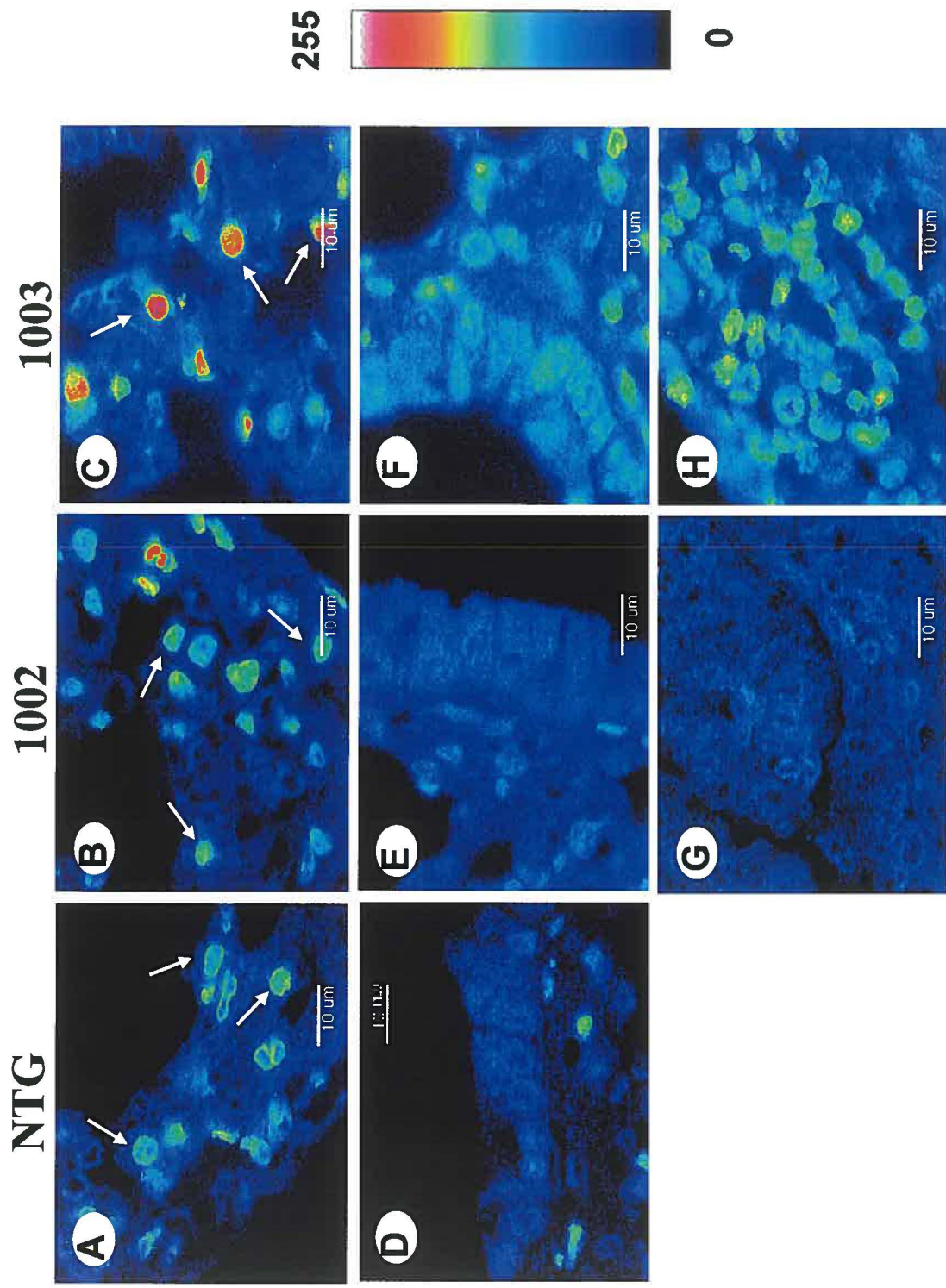
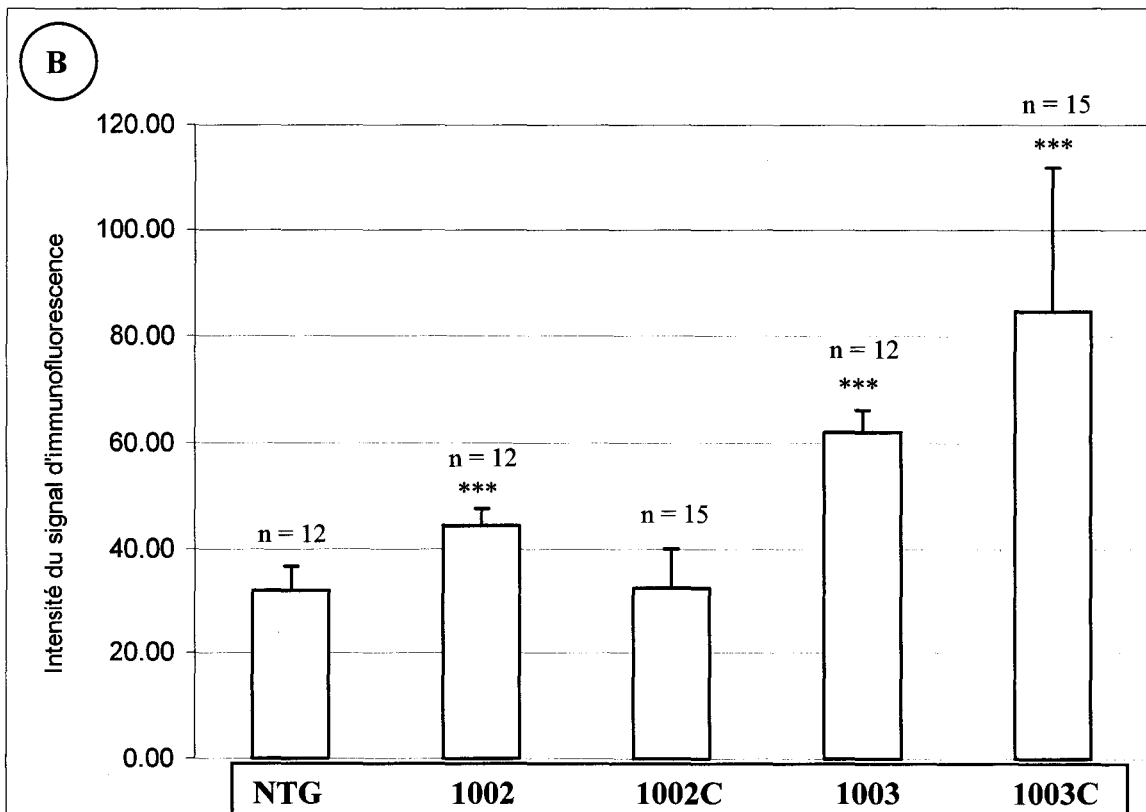
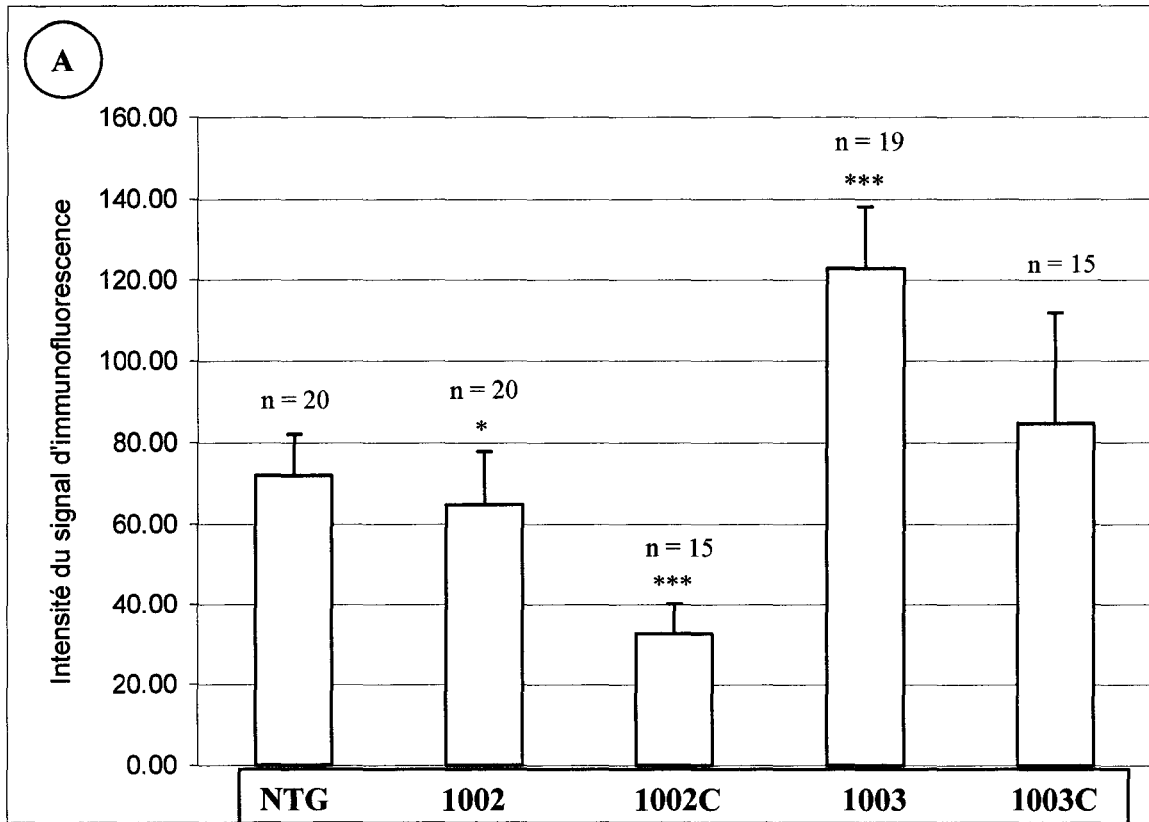


Figure 12. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-2 chez les cellules AS-RAR β 1/ β 3

L'intensité du signal d'immunofluorescence observé chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara a été mesurée par analyse des images obtenues par microscopie confocale avec le logiciel Intervision, version Unix. Ces mesures sont représentées graphiquement par la moyenne établie sur une population de cellules. Une barre d'erreur est indiquée au-dessus des colonnes. Les graphiques regroupent les lignées porteuses de la construction AS-RAR β 1/ β 3. Sur le graphique A, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les pneumocytes de type II non transgéniques et des lignées 1002 et 1003 est présentée. Sur le graphique B, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules de Clara non transgéniques et des lignées 1002 et 1003 est exposée. L'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses des lignées 1002 et 1003 (respectivement 1002C et 1003C) a été placée en parallèle avec celles des pneumocytes de type II et des cellules de Clara. Les symboles * et *** indiquent respectivement une différence significative ($p < 0.05$) et une différence extrêmement significative ($p < 0.0001$) entre la valeur obtenue chez les cellules contrôles et celles obtenues pour les cellules transgéniques.



4.1.2.2 Lignées AS-RAR β 2

L'analyse par microscopie confocale de l'intensité relative du signal d'immunofluorescence d'Hoxa-2 révèle que l'expression de la protéine Hoxa-2 est aussi modifiée dans les cellules pulmonaires de nos souris transgéniques AS-RAR β 2. En fait, la sous-expression du récepteur RAR β 2 affecte à la baisse l'expression d'Hoxa-2.

Chez les pneumocytes de type II AS-RAR β 2, le signal d'immunofluorescence est inférieur par rapport aux pneumocytes de type II non transgéniques (figure 13 A, B, C et D). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire chez les pneumocytes de type II ont donné des valeurs de 50.45 ± 23.46 ($p > 0.05$, $n = 20$) pour la lignée 422, de 36.83 ± 18.72 ($p < 0.05$, $n = 20$) pour la lignée 426 et de 26.28 ± 8.80 ($p < 0.0001$, $n = 20$) pour la lignée 432, par rapport à la valeur de 52.04 ± 21.11 ($n = 18$) pour les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 14 A). Donc, l'intensité du signal d'immunofluorescence n'est pas différente chez les pneumocytes de type II de la lignée 422, mais diminue respectivement de 31% et de 50% chez les pneumocytes de type II des lignées 426 et 432.

Chez les cellules de Clara AS-RAR β 2, le signal d'immunofluorescence est inférieur par rapport aux cellules de Clara non transgéniques (figure 13 E, F, G et H). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire chez les cellules de Clara transgéniques ont donné respectivement des valeurs de 21.02 ± 1.89 ($p < 0.0001$, $n = 12$) pour les cellules de Clara de la lignée 422, de 24.10 ± 3.09 ($p < 0.0001$, $n = 12$) pour les cellules de Clara de la lignée 426 et de 21.43 ± 2.01 ($p < 0.0001$, $n = 12$) pour les

cellules de Clara de la lignée 432, par rapport à la valeur de 39.13 ± 5.12 ($n = 12$) pour les cellules de Clara non transgéniques (figure 14 B). L'intensité du signal diminue donc de 46 % chez les cellules de Clara de la lignée 422, de 48 % chez les cellules de Clara de la lignée 426 et de 45 % chez les cellules de Clara de la lignée 432 par rapport aux cellules de Clara non transgéniques.

Chez les cellules cancéreuses des lignées 422, 426 et 432, l'intensité du signal d'immunofluorescence est très faible et similaire pour les trois lignées (figure 13 I, J et K). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence ont donné des résultats de 17.63 ± 3.74 ($n = 15$) pour la lignée 422, de 8.94 ± 1.44 ($n = 15$) pour la lignée 426 et de 7.52 ± 2.12 ($n = 15$) pour la lignée 432 (figure 14). Par rapport à l'intensité du signal des pneumocytes de type II non transgéniques (de 52.04 ± 21.11 , $n = 18$), ces intensités sont respectivement inférieures de 66 %, de 83 % et de 86% ($p < 0.0001$) pour les lignées 422, 426 et 432. Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence cellules de Clara non transgéniques (de 39.13 ± 5.12 , $n = 12$), l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses des lignées 422, 426 et 432 est aussi inférieure de 66 %, de 83 %, et de 86 % respectivement ($p < 0.0001$). L'expression de la protéine Hoxa-2 est donc pratiquement inhibée chez les cellules cancéreuses pulmonaires des lignées AS-RAR β 2.

Figure 13. Variations d'expression de Hoxa-2 chez les souris transgéniques

AS-RAR β 2

L'anticorps anti-Hoxa-2 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules pulmonaires des souris transgéniques des lignées 422 (B, F et I), 426 (C, G et J) et 432 (D, H et K) en parallèle à celles des souris non-transgéniques (A et E). Les cellules pulmonaires observées plus particulièrement sont les pneumocytes de type II (A, B, C et D), les cellules de Clara (E, F, G, H) et les cellules tumorales pulmonaires (I, J et K) provenant d'une même souris transgénique. L'intensité du signal d'immunofluorescence est indiquée par l'échelle pseudo-colorée située à droite de la figure qui va de 0 à 255 (visuellement, du noir vers le blanc). L'échelle de taille dans les panneaux A à H correspond à 10 μ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.

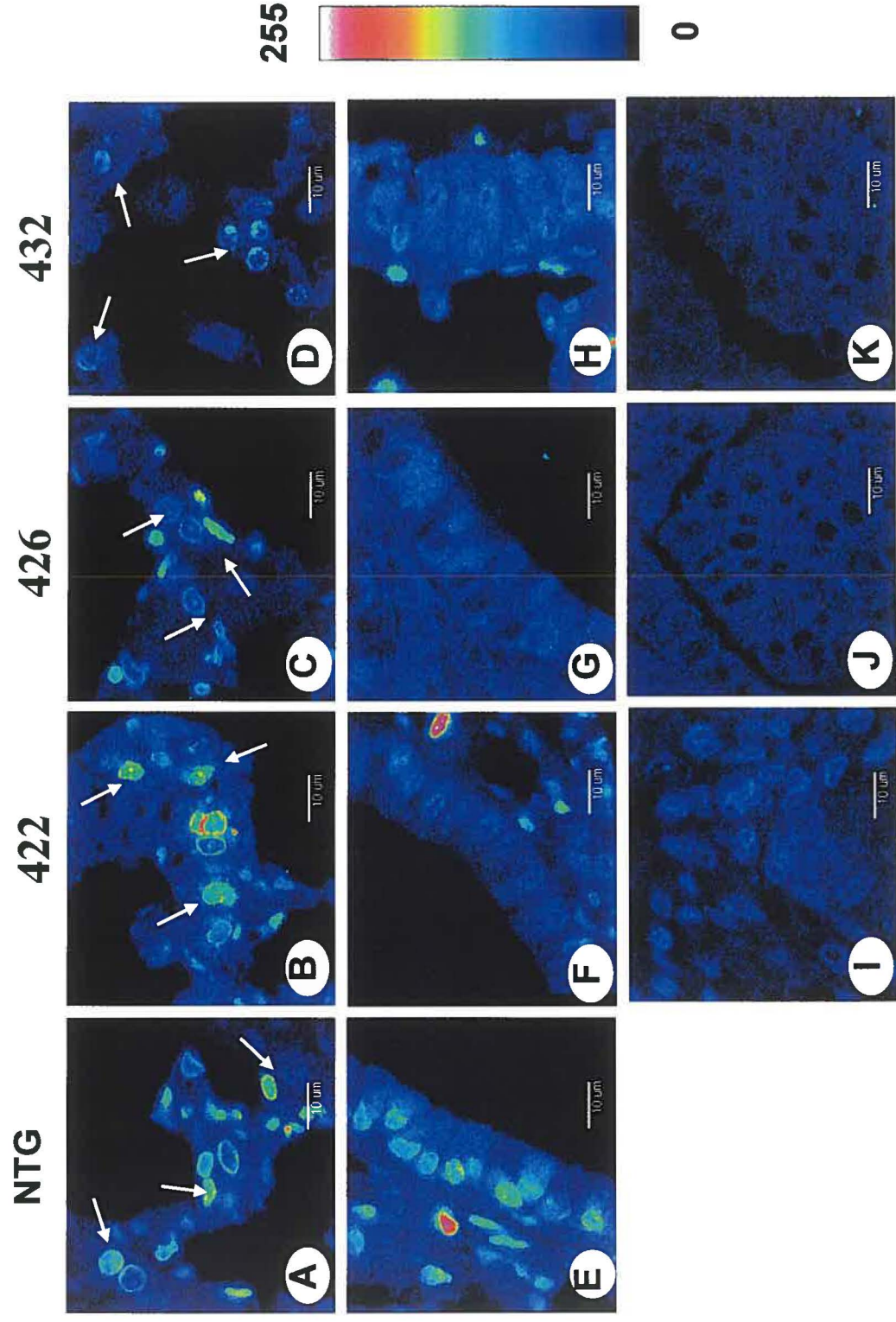
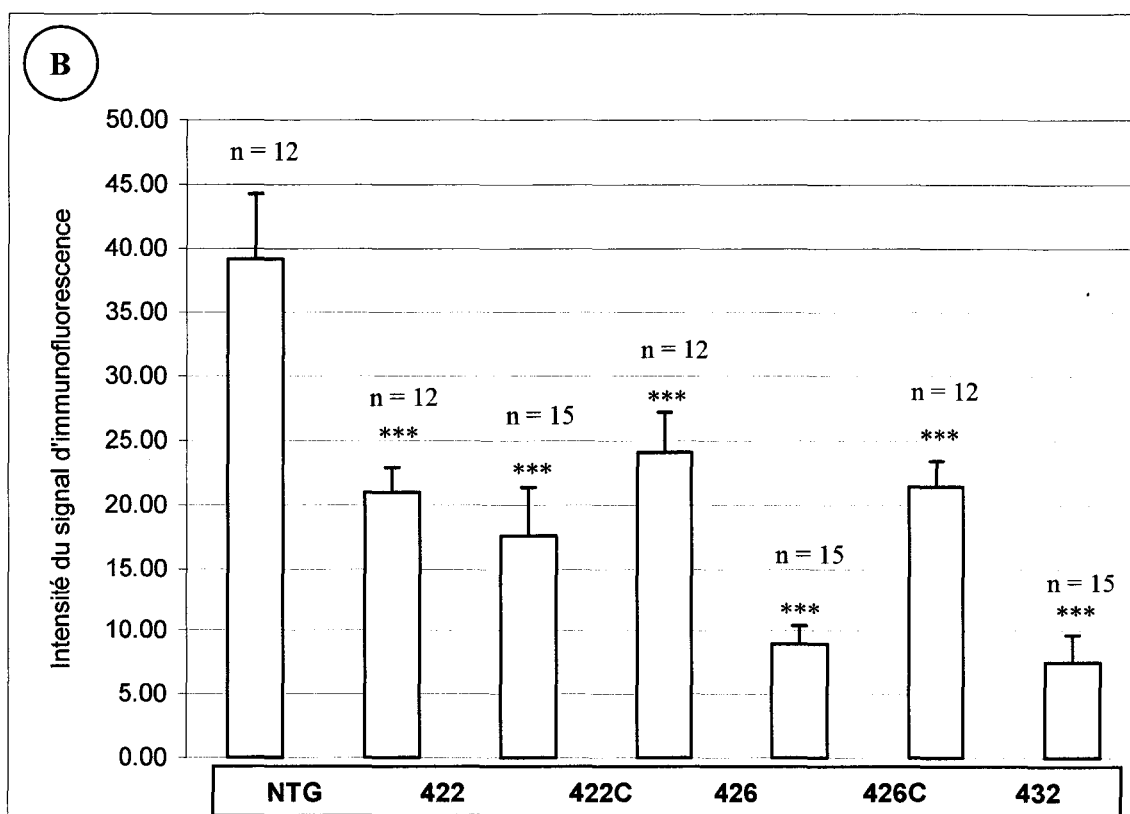
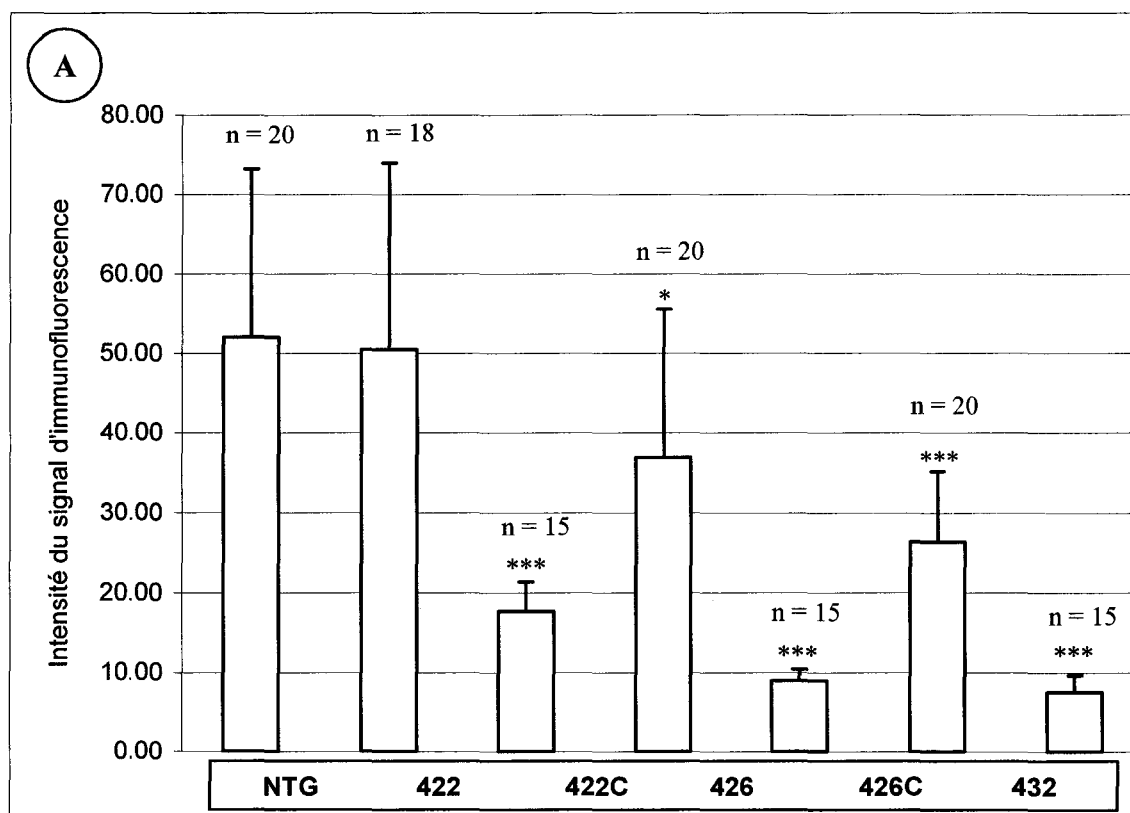


Figure 14. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-2 chez les cellules AS-RAR β 2

L'intensité du signal d'immunofluorescence observé chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara a été mesurée par analyse des images obtenues par microscopie confocale avec le logiciel Intervision, version Unix. Ces mesures sont représentées graphiquement par la moyenne établie sur une population de cellules. Une barre d'erreur indiquée au-dessus des colonnes. Les graphiques regroupent les lignées porteuses de la construction AS-RAR β 2. Sur le graphique A, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les pneumocytes de type II non transgéniques et des lignées 422.426 et 432 est présentée. Sur le graphique B, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules de Clara non transgéniques et des lignées 422, 426 et 432 est exposée. L'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses des lignées 422, 426 et 432 (respectivement 422C, 426C et 432C) a été placée en parallèle avec celles des pneumocytes de type II et des cellules de Clara transgéniques et non transgéniques. Les symboles * et *** indiquent respectivement une différence significative ($p < 0.05$) et une différence extrêmement significative ($p < 0.0001$) entre la valeur obtenue chez les cellules contrôles et celles obtenues chez les cellules transgéniques.



4.1.2.3 Lignées RAR β 4-LIKE

Chez nos souris transgéniques AS-RAR β 4-LIKE, l'analyse par microscopie confocale de l'intensité relative du signal d'immunofluorescence d'Hoxa-2 nous permet également de constater la variation de l'expression de la protéine Hoxa-2. La sur-expression du récepteur RAR β 4 affecte à la hausse l'expression de la protéine Hoxa-2.

Chez les pneumocytes de type II RAR β 4-LIKE, l'intensité du signal d'immunofluorescence est forte par rapport à celle observée chez les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 15 A, B et C). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire ont donné des résultats de 86.77 ± 26.64 ($p < 0.0001$, $n = 23$) pour les pneumocytes de type II de la lignée 32, de 67.96 ± 11.85 ($p < 0.0001$, $n = 20$) pour les pneumocytes de type II de la lignée 5005 et de 47.36 ± 20.29 ($n = 20$) pour les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 16 A). L'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules RAR β 4-LIKE est de ce fait plus élevée de 83 % pour les pneumocytes de type II de la lignée 32 et de 43 % pour les pneumocytes de type II de la lignée 5005 par rapport aux pneumocytes de type II non transgéniques.

Chez les cellules de Clara RAR β 4-LIKE, le signal d'immunofluorescence augmente par rapport aux cellules de Clara non transgéniques (figure 15 D, E et F). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire ont donné des résultats de 46.85 ± 4.17 ($p < 0.0001$, $n = 17$) pour les cellules de Clara de la lignée 32, de 52.16 ± 6.39 ($p < 0.0001$, $n = 20$) pour les cellules de Clara de la lignée 5005 et de 26.90 ± 6.94 ($n = 20$) pour les cellules de Clara non transgéniques (figure 16 B). L'intensité du signal

d'immunofluorescence des cellules de Clara des lignées 32 et 5005 est donc respectivement plus élevée de 122% et de 94% par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara non transgéniques.

Chez les cellules cancéreuses des lignées 32 et 5005, l'intensité du signal d'immunofluorescence varie beaucoup et montre une différence entre les deux lignées (figure 15 G et H). L'intensité du signal d'immunofluorescence a été calculée de 61.11 ± 37.14 ($n = 15$) pour les cellules cancéreuses de la lignée 32 et de 34.92 ± 8.56 ($n = 15$) pour les cellules cancéreuses de la lignée 5005 (figure 16). Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II non transgéniques (de 47.36 ± 20.29 , $n = 20$), l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses de la lignée 32 est supérieure de 29 % ($p < 0.001$) et celle des cellules cancéreuses de la lignée 5005 est au contraire inférieure de 26 % ($p < 0.05$). Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara non transgéniques (de 26.90 ± 6.94 , $n = 15$), l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules cancéreuses des deux lignées RAR β 4-LIKE est supérieure de 30 % ($p < 0.001$ pour la lignée 32 et $p < 0.05$ pour la lignée 5005). Donc, la protéine Hoxa-2 tendrait à être surexprimée chez les cellules cancéreuses RAR β 4-LIKE.

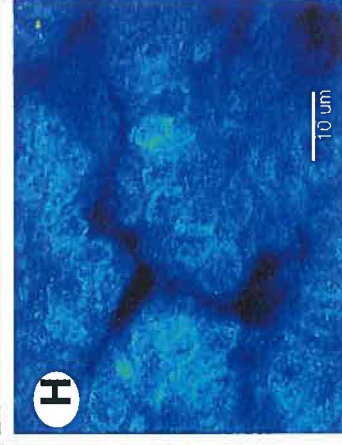
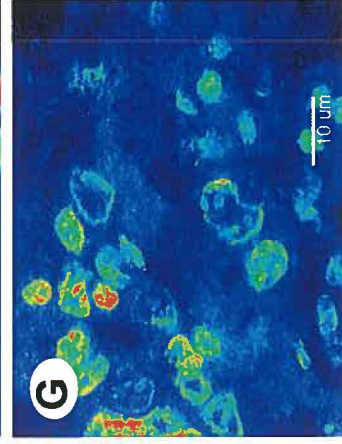
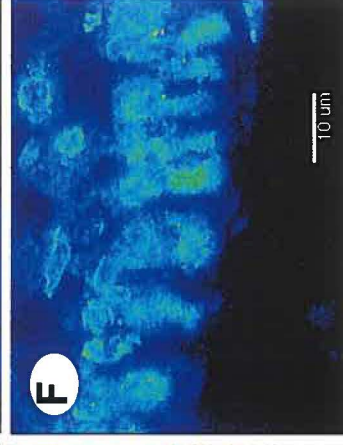
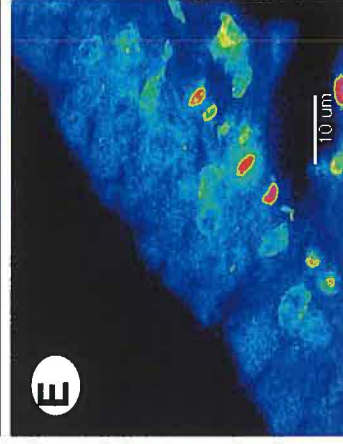
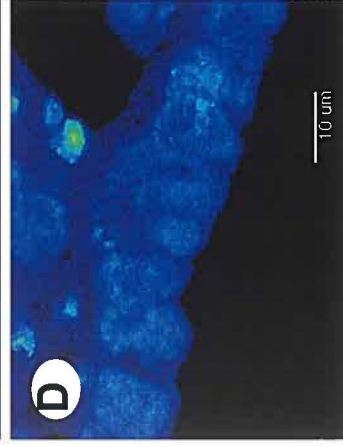
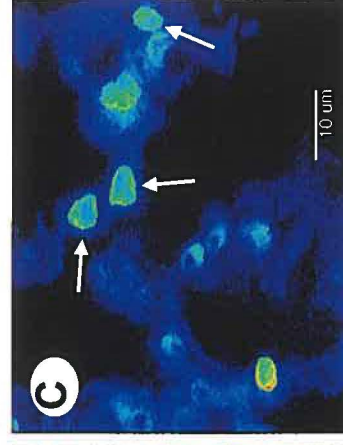
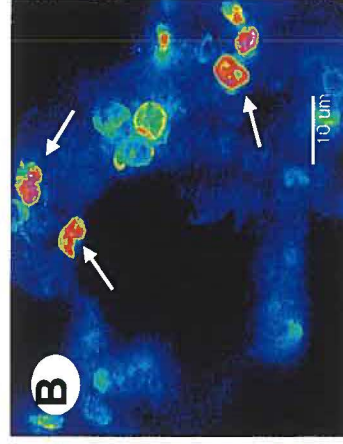
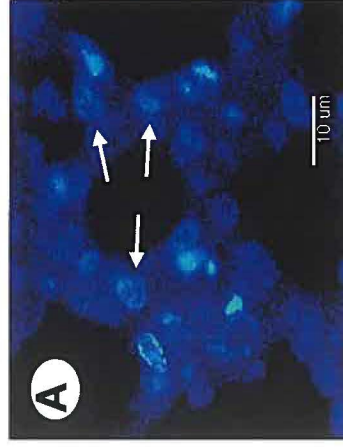
Figure 15. Variations d'expression de la protéine Hoxa-2 chez les souris transgéniques RAR β 4-LIKE

L'anticorps anti-Hoxa-2 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence dans les cellules pulmonaires des souris transgéniques des lignées 32 (B, E et G) et 5005 (C, F et H) en parallèle à celles des souris non-transgéniques (A et D). Les cellules pulmonaires observées plus particulièrement sont les pneumocytes de type II (A, B et C), les cellules de Clara (D, E et F) et les cellules tumorales pulmonaires (G et H) provenant d'une même souris transgénique. L'intensité du signal d'immunofluorescence est indiquée par l'échelle pseudo-colorée qui va de 0 à 255 (visuellement, du noir vers le blanc) et située à droite de la figure. L'échelle de taille dans les panneaux A à H correspond à 10 μ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.

NTG

32

5005



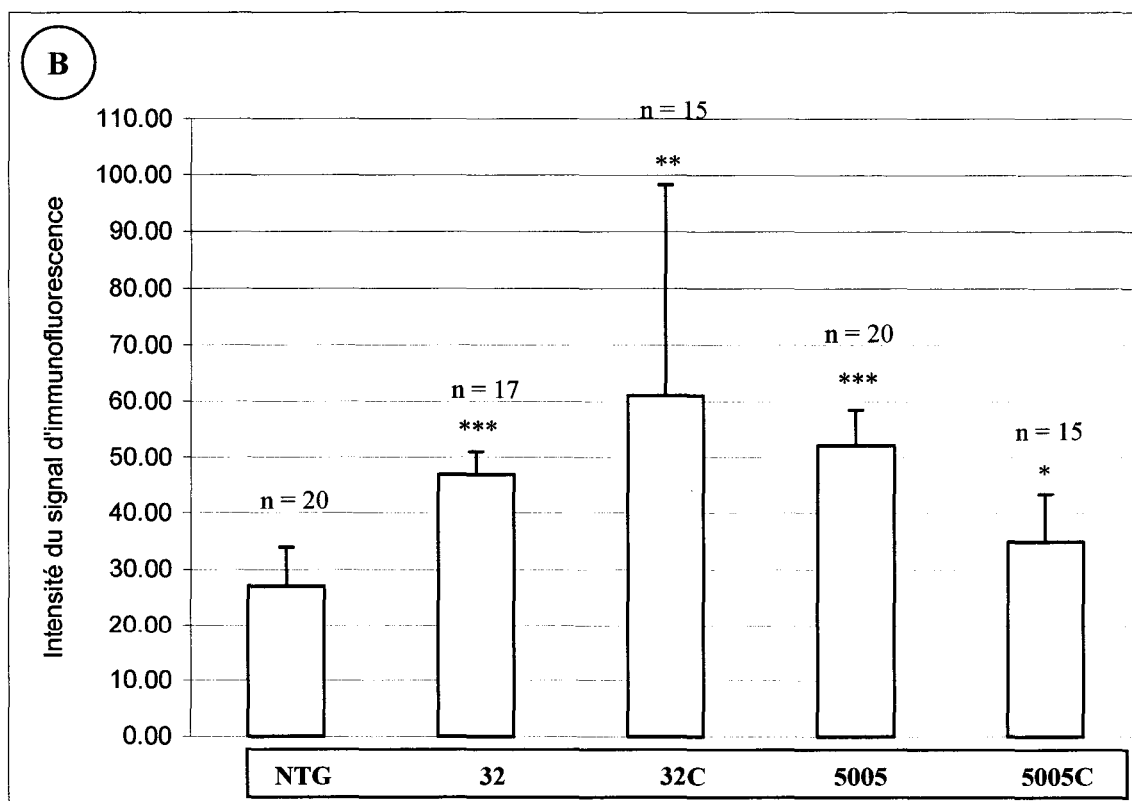
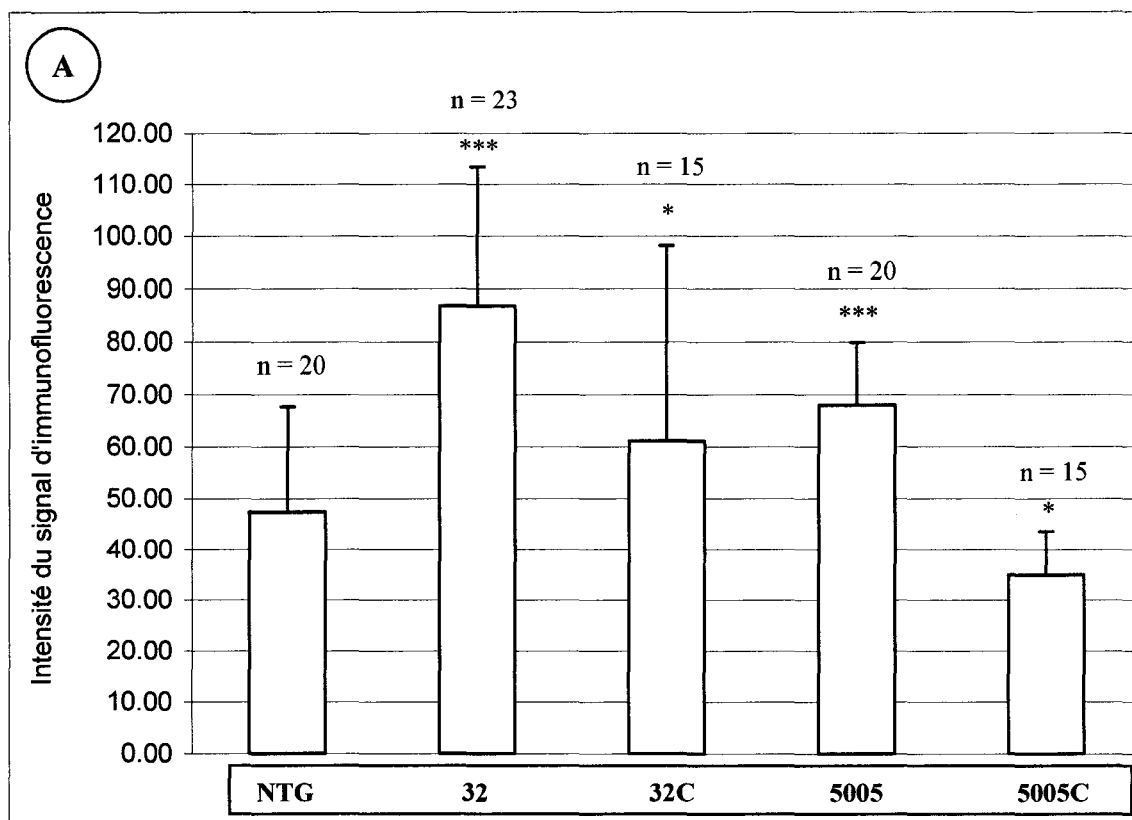
255



0

Figure 16. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-2 chez les cellules RAR β 4-LIKE

L'intensité du signal d'immunofluorescence observé chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara a été mesurée par analyse des images obtenues par microscopie confocale avec le logiciel Intervision, version Unix. Ces mesures sont représentées graphiquement par la moyenne établie sur une population de cellules. Une barre d'erreur est indiquée au-dessus des colonnes. Les graphiques regroupent les lignées porteuses de la construction RAR β 4-LIKE. Sur le graphique A, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les pneumocytes de type II non transgéniques et des lignées 32 et 5005 est présentée. Sur le graphique B, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules de Clara non transgéniques et des lignées 32 et 5005 est exposée. L'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses des lignées 32 et 5005 (respectivement 32C, 5005C) a été placée en parallèle avec celles des pneumocytes de type II et des cellules de Clara. Les symboles *, ** et *** indiquent respectivement une différence significative ($p < 0.05$), une différence très significative ($p < 0.001$) et une différence extrêmement significative ($p < 0.0001$) entre la valeur des cellules contrôles et celle des cellules transgéniques.



4.1.3 Résultats du marquage contre la protéine Hoxa-4

Le gène *Hoxa-4* est le quatrième gène Hox à partir de l'extrémité 3' du complexe A (Apiou et al., 1996). Les séquences régulatrices comprennent un RARE sur lequel les RAR et les RXR se lient et mènent à la transactivation ou à la trans-répression du gène *Hoxa-4* en présence des RA (Packer et al., 1998). Si l'expression des RAR est modifiée, comme chez nos souris transgéniques présentant des altérations d'expression des récepteurs nucléaires RAR β , l'expression du gène *Hoxa-4* devrait aussi être changée. De plus, les variations d'expression des protéines Hoxa-1 et Hoxa-2 observées chez nos souris transgéniques peuvent provoquer, via la régulation en cascade de l'expression des gènes HOX, l'expression anormale du gène *Hoxa-4* qui est situé en 5' dans le complexe A (Ogura et Evans, 1995). Chez les souris transgéniques des lignées AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE, nous nous attendons donc à observer une expression aberrante de la protéine Hoxa-4.

4.1.3.1 Lignées AS-RAR β 1/ β 3

L'analyse par microscopie confocale de l'intensité relative du signal d'immunofluorescence de Hoxa-4 chez nos souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3 a révélé une expression anormale de la protéine Hoxa-4. La sous-expression des récepteurs RAR β 1 et RAR β 3 affecte à la hausse ou à la baisse l'expression de cette protéine, selon le type cellulaire examiné et la lignée de souris transgéniques.

Chez les pneumocytes de type II AS-RAR β 1/ β 3, le signal d'immunofluorescence augmente ou diminue selon la lignée par rapport à celui observé chez les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 17 A, B et C). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire chez les pneumocytes de type II des lignées 1002 et 1003 ont donné des valeurs de 118.72 ± 22.17 ($p < 0.0001$, $n = 30$) et de 69.90 ± 12.15 ($p < 0.0001$, $n = 30$) par rapport à la valeur de 82.41 ± 12.81 ($n = 20$) pour les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 18 A). Par rapport aux pneumocytes non transgéniques, l'intensité du signal d'immunofluorescence augmente donc de 44 % pour les pneumocytes de type II de la lignée 1002, alors qu'elle diminue de 15 % pour les pneumocytes de type II de la lignée 1003.

Chez les cellules de Clara transgéniques des lignées 1002 et 1003, l'intensité du signal d'immunofluorescence diminue par rapport aux cellules de Clara non transgéniques (figure 17 D, E et F). L'intensité du signal d'immunofluorescence a été calculé de 45.51 ± 3.26 ($p < 0.0001$, $n = 14$) pour les cellules de Clara de la lignée 1002, de 49.51 ± 5.12 ($p < 0.0001$, $n = 15$) pour la lignée 1003 et de 66.60 ± 8.34 ($n = 15$) pour les cellules de Clara non transgéniques (figure 18 B). Par rapport aux cellules de Clara non transgéniques, l'intensité du signal d'immunofluorescence diminue donc de 32 % et de 26 % respectivement pour les cellules de Clara des lignées 1002 et 1003.

Chez les cellules cancéreuses AS-RAR β 1/ β 3, l'intensité du signal d'immunofluorescence varie beaucoup et montre une différence entre les deux lignées (figure 17 G et H). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence ont

donné des résultats de 72.46 ± 25.67 ($n = 20$) pour les cellules cancéreuses de la lignée 1002 et de 30.68 ± 8.70 ($n = 15$) pour les cellules cancéreuses de la lignée 1003 (figure 18). Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II non transgéniques (de 82.41 ± 12.81 , $n = 20$), l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses de la lignée 1002 diminue de 12 % ($p < 0.05$) et de celle des cellules cancéreuses de la lignée 1003 diminue de 63 % ($p < 0.0001$; figure 18 A). Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara non transgéniques (de 66.60 ± 8.34 , $n = 15$), l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses 1002 n'est pas différente, alors que celle des cellules cancéreuses 1003 est inférieure de 34 % ($p < 0.0001$; figure 18 B). La protéine Hoxa-4 tend donc à être sous-exprimée dans les cellules cancéreuses pulmonaires ASRAR β 1/ β 3.

Figure 17. Variations d'expression de Hoxa-4 chez les souris AS-RAR β 1/ β 3

L'anticorps anti-Hoxa-4 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules pulmonaires des souris transgéniques des lignées 1002 (B, E et G) et 1003 (C, F et H) en parallèle à celles des souris non-transgéniques (A et D). Les cellules pulmonaires observées plus particulièrement sont les pneumocytes de type II (A, B et C), les cellules de Clara (D, E et F) et les cellules tumorales pulmonaires (G et H) provenant d'une même souris transgénique. L'intensité du signal d'immunofluorescence est indiquée par l'échelle pseudo-colorée qui va de 0 à 255 (visuellement, du noir vers le blanc) et située à droite de la figure. L'échelle de taille dans les panneaux A à H correspond à 10 μ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.

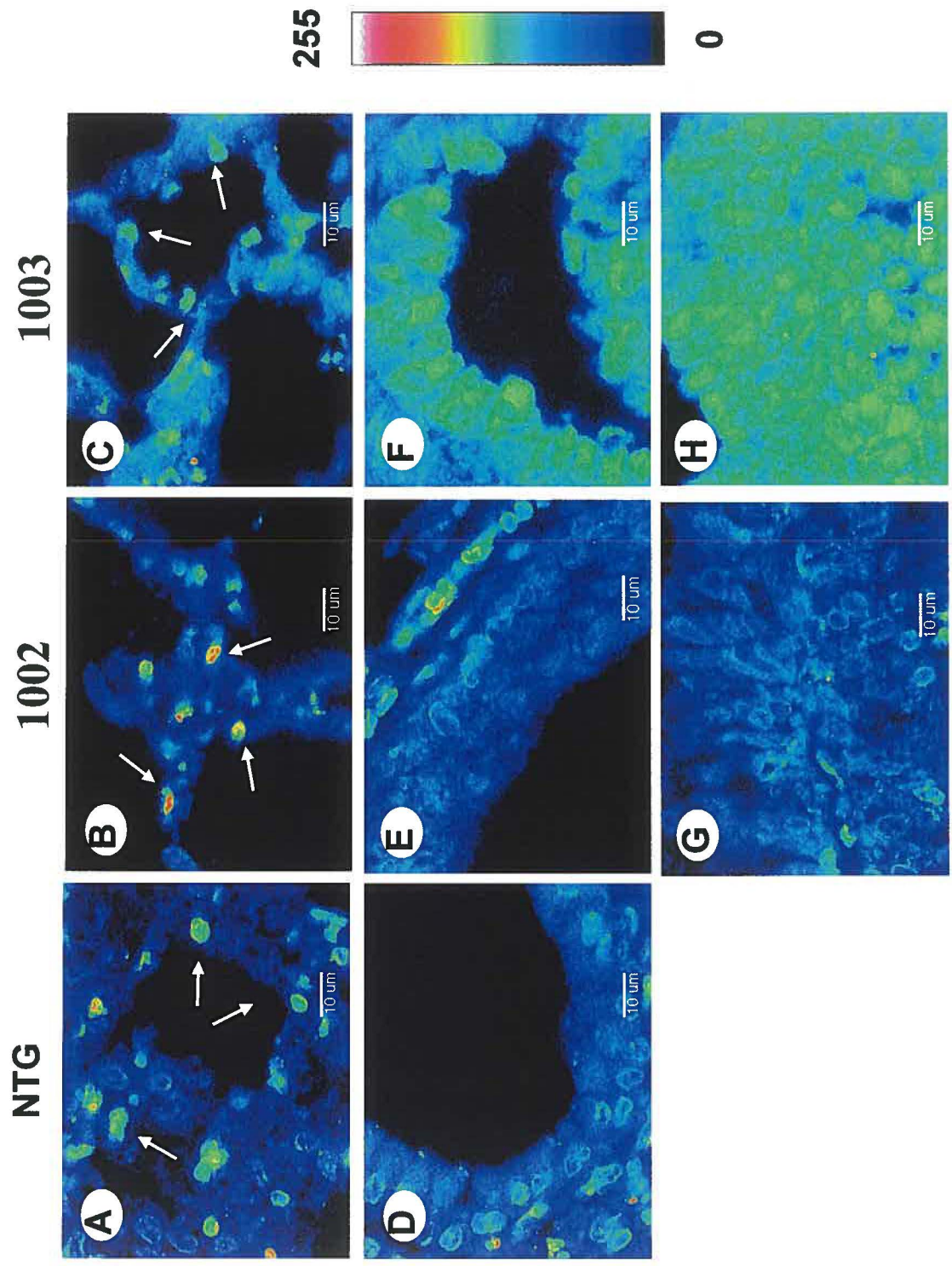
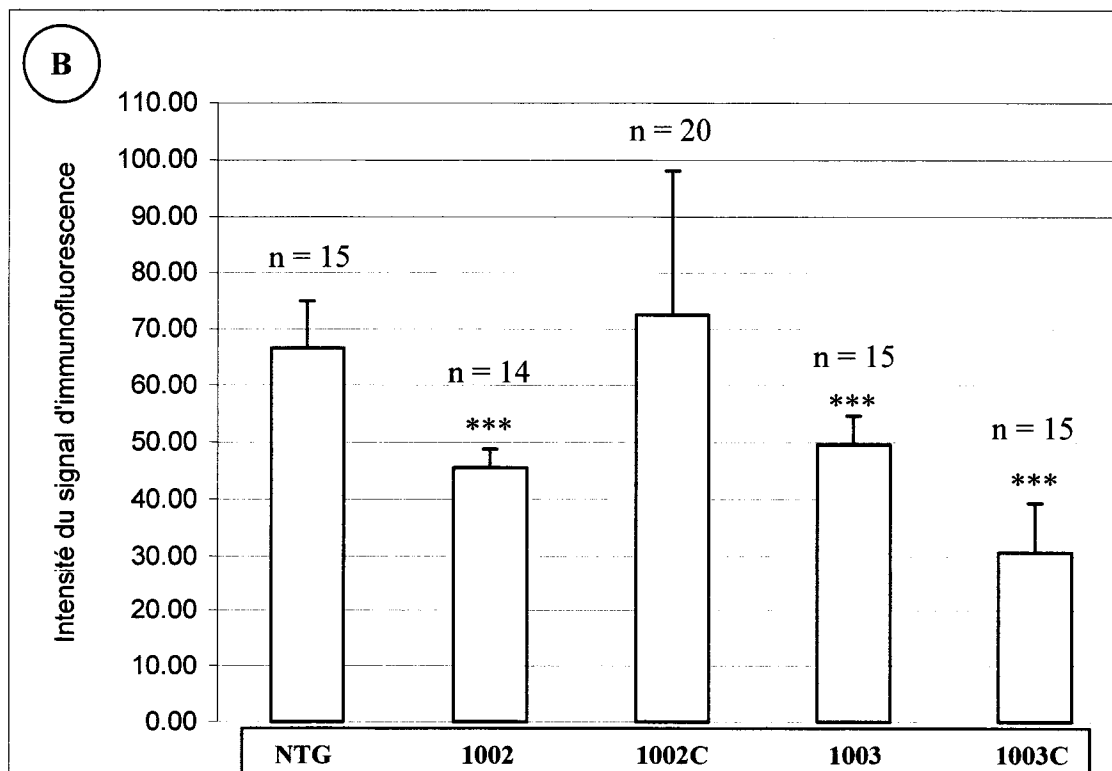
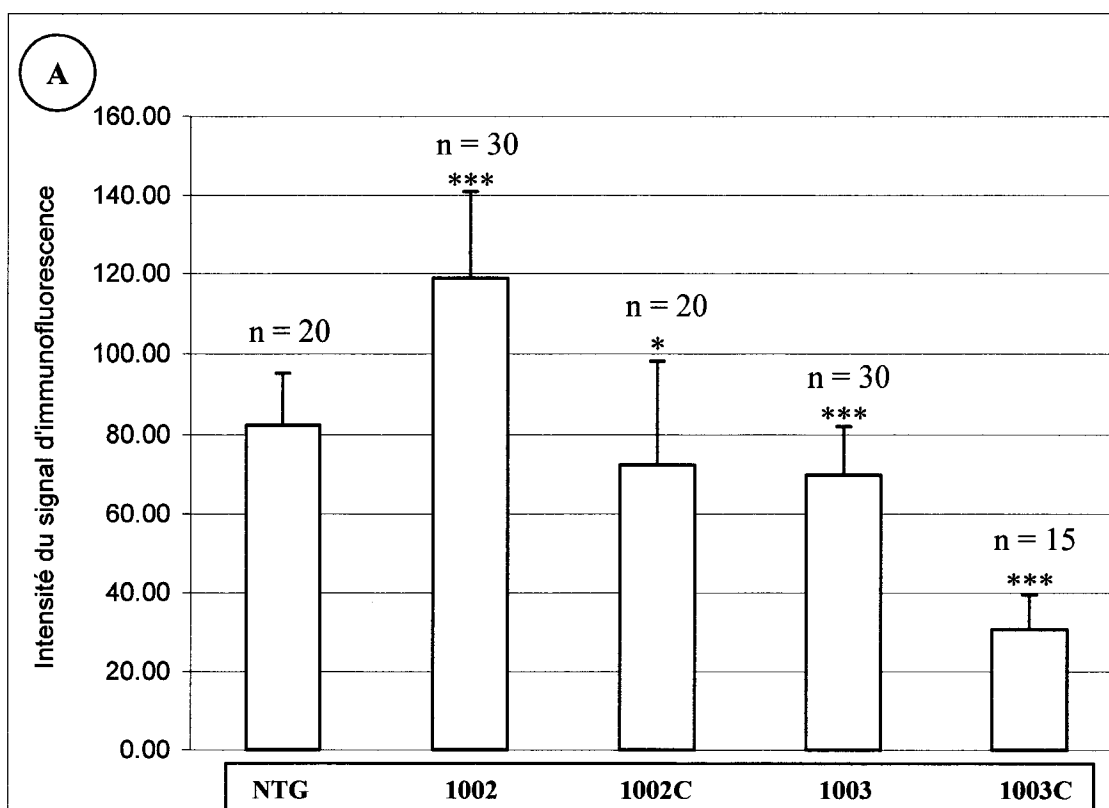


Figure 18. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-4 chez les cellules AS-RAR β 1/ β 3

L'intensité du signal d'immunofluorescence observé chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara a été mesurée par analyse des images obtenues par microscopie confocale avec le logiciel Intervision, version Unix. Ces mesures sont représentées graphiquement par la moyenne établie sur une population de cellules. Une barre d'erreur est indiquée au-dessus des colonnes. Les graphiques regroupent les lignées porteuses de la construction AS-RAR β 1/ β 3. Sur le graphique A, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les pneumocytes de type II non transgéniques et des lignées 1002 et 1003 est présentée. Sur le graphique B, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules de Clara non transgéniques et des lignées 1002 et 1003 est exposée. L'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses des lignées 1002 et 1003 (respectivement 1002C et 1003C) a été placée en parallèle avec celles des pneumocytes de type II et des cellules de Clara. Les symboles * et *** indiquent respectivement une différence significative ($p < 0.05$) et une différence extrêmement significative ($p < 0.0001$) entre la valeur des cellules contrôles et celle des cellules transgéniques.



4.1.3.2 Lignées AS-RAR β 2

L'analyse par microscopie confocale de l'intensité du signal d'immunofluorescence de Hoxa-4 chez nos souris transgéniques AS-RAR β 2 révèle des variations d'expression de la protéine Hoxa-4. La sous-expression des récepteurs RAR β 2 affecte à la baisse l'expression de la protéine Hoxa-4.

Chez les pneumocytes de type II AS-RAR β 2, le signal d'immunofluorescence diminue en intensité par rapport à celui des pneumocytes de type II non transgéniques (figure 19 A, B, C et D). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire chez les pneumocytes de type II des lignées AS-RAR β 2 ont donné des résultats de 96.58 ± 25.31 ($p < 0.05$, $n = 23$) pour la lignée 422, de 82.44 ± 18.01 ($p < 0.05$, $n = 21$) pour la lignée 426 et de 88.61 ± 21.97 ($p > 0.05$, $n = 23$) pour la lignée 432, par rapport à 117.55 ± 35.30 ($n = 14$) pour les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 20 A). Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II non transgéniques, les intensités du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II des lignées 422 et 426 diminuent donc respectivement de 16 % et de 30 %, alors que l'intensité du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II de la lignée 432 n'est en pas différente.

Chez les cellules de Clara AS-RAR β 2, le signal d'immunofluorescence varie et montre une différence selon les trois lignées par rapport aux cellules de Clara non transgéniques (figure 19 E, F, G et H). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire chez les cellules de Clara ASRAR β 2 ont donné des

résultats de 93.63 ± 14.33 ($p > 0.05$, $n = 15$) pour la lignée 422, de 101.01 ± 10.19 ($p < 0.05$, $n = 15$) pour la lignée 426 et de 51.69 ± 7.06 ($p < 0.0001$, $n = 15$) pour la lignée 432, par rapport à la valeur de 84.12 ± 19.98 ($n = 15$) pour les cellules de Clara non transgéniques (figure 20 B). Par rapport à l'intensité du signal cellulaire des cellules de Clara non transgéniques, l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara de la lignée 422 n'est donc pas différente, alors que l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara de la lignée 426 augmente de 20 % et que celle des cellules de Clara de la lignée 432 diminue de 39 %.

Chez les cellules cancéreuses AS-RAR β 2, l'intensité du signal d'immunofluorescence est très variable et montre une différence entre les trois lignées (figure 19 I, J et K). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence ont donné des résultats de 71.60 ± 22.81 ($n = 16$) pour la lignée 422, de 41.53 ± 7.96 ($n = 16$) pour la lignée 426 et de 28.55 ± 7.21 ($n = 15$) pour la lignée 432. Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II non transgéniques (de 117.55 ± 35.30 , $n = 14$), ces intensités sont inférieures de 39 % ($p < 0.001$) pour la lignée 422, de 75 % ($p < 0.0001$) pour la lignée 426 et de 76 % ($p < 0.0001$) pour la lignée 432 (figure 20 A). Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara non transgéniques (de 84.12 ± 19.98 , $n = 15$), l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses de la lignée 422 n'est pas différente, contrairement aux intensités du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses des lignées 426 et 432 qui sont respectivement inférieures de 51 % ($p < 0.0001$) et de 66 % (p

< 0.0001; figure 20 B). La protéine Hoxa-4 tend donc à être sous-exprimée dans les cellules cancéreuses pulmonaires des lignées AS-RAR β 2.

**Figure 19. Variations d'expression de Hoxa-4 chez les souris transgéniques AS-
RAR β 2**

L'anticorps anti-Hoxa-4 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules pulmonaires des souris transgéniques des lignées 422 (B, F et I), 426 (C, G et J) et 432 (D, H et K) en parallèle à celles des souris non-transgéniques (A et E). Les cellules pulmonaires observées plus particulièrement sont les pneumocytes de type II (A, B, C et D), les cellules de Clara (E, F, G, H) et les cellules tumorales pulmonaires (I, J et K) provenant d'une même souris transgénique. L'intensité du signal d'immunofluorescence est indiquée par l'échelle pseudo-colorée qui va de 0 à 255 (visuellement, du noir vers le blanc) et est située à droite de la figure. L'échelle de taille dans les panneaux A à H correspond à 10 μ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.

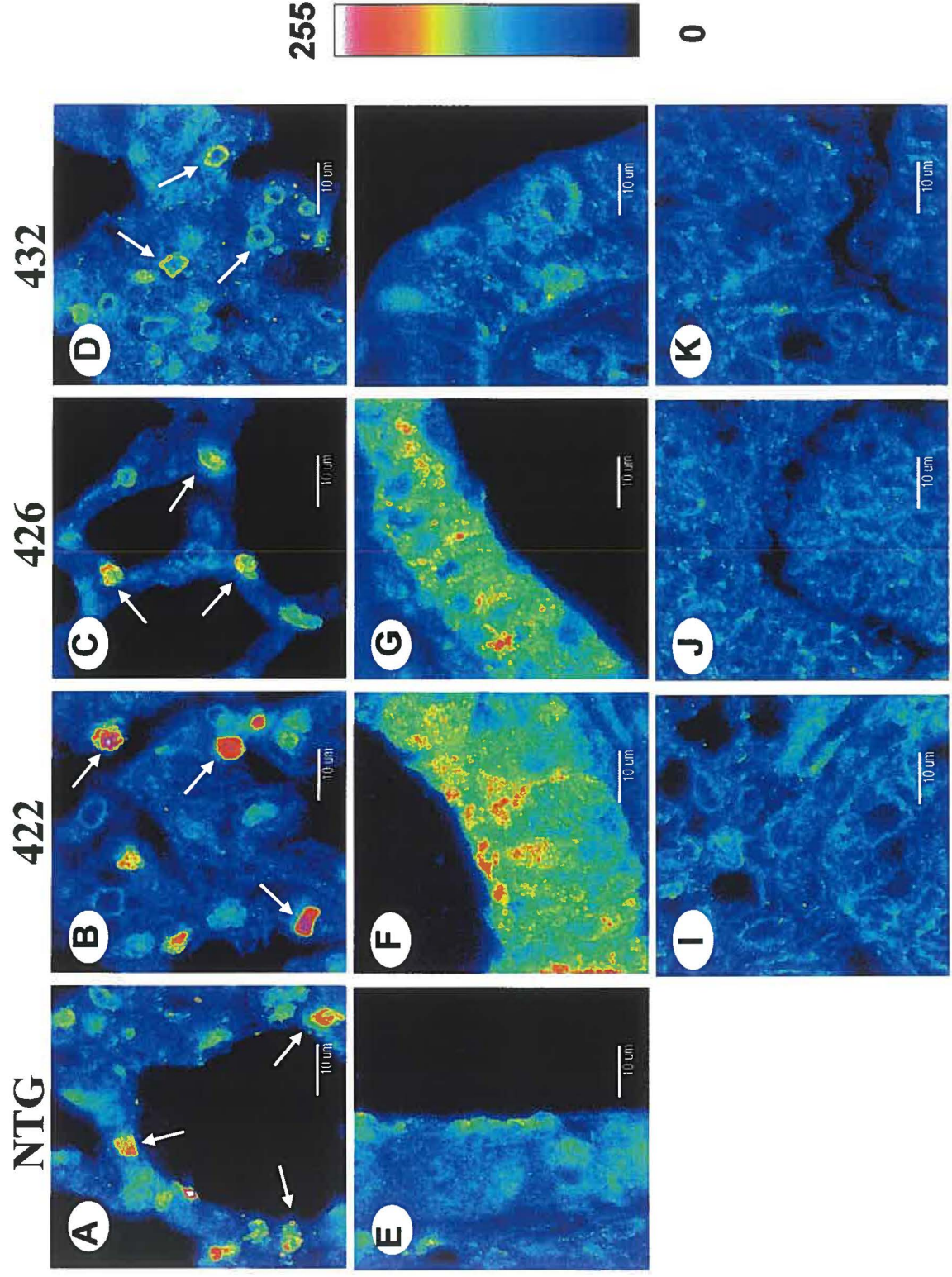
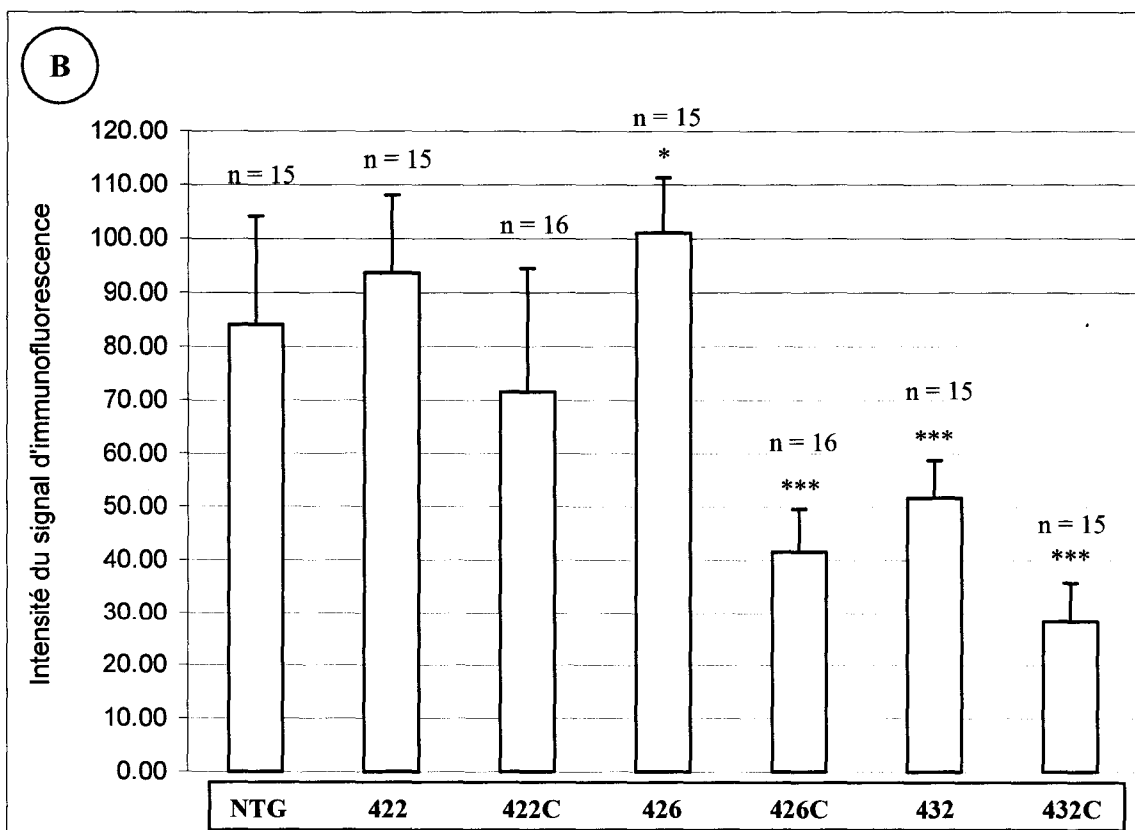
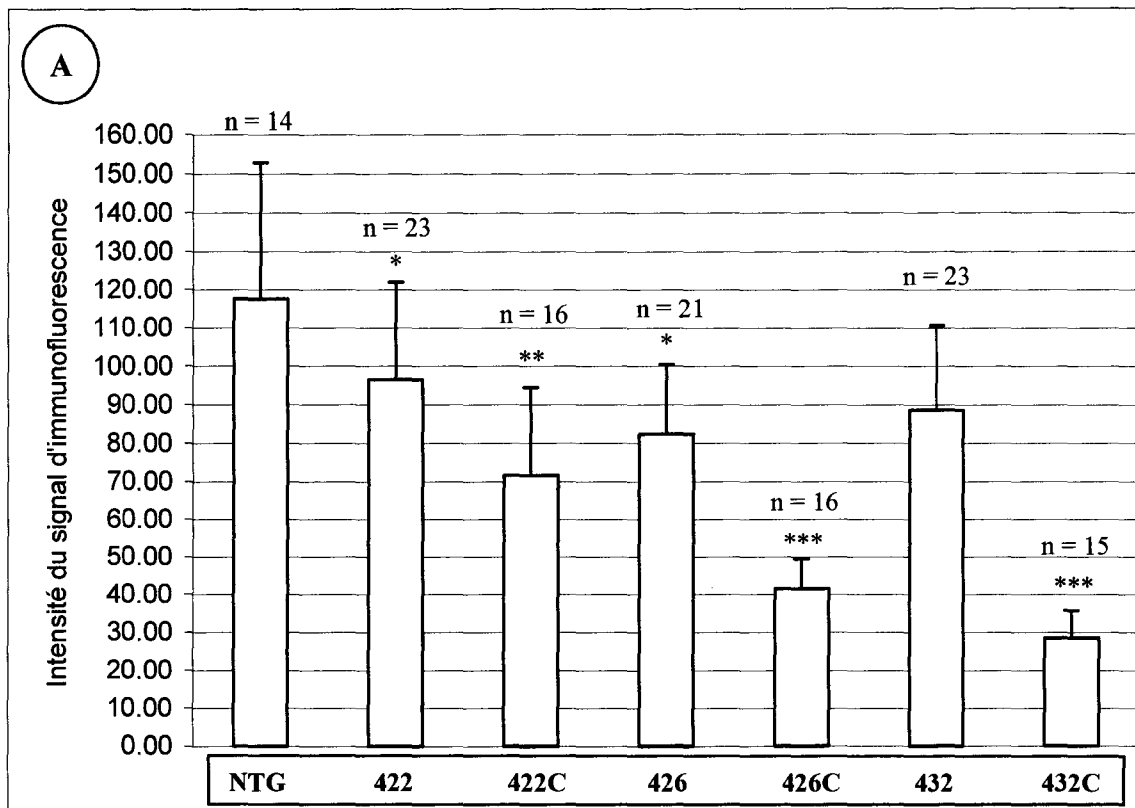


Figure 20. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-4 chez les cellules AS-RAR β 2

L'intensité du signal d'immunofluorescence observé chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara a été mesurée par analyse des images obtenues par microscopie confocale avec le logiciel Intervision, version Unix. Ces mesures sont représentées graphiquement par la moyenne établie sur une population de cellules. Une barre d'erreur est indiquée au-dessus des colonnes. Les graphiques regroupent les lignées porteuses de la construction AS-RAR β 2. Sur le graphique A, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les pneumocytes de type II non transgéniques et des lignées 422.426 et 432 est présentée. Sur le graphique B, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules de Clara non transgéniques et des lignées 422, 426 et 432 est exposée. L'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses des lignées 422, 426 et 432 (respectivement 422C, 426C et 432C) a été placée en parallèle avec celles des pneumocytes de type II et des cellules de Clara transgéniques et non transgéniques. Les symboles *, **, et *** indiquent respectivement une différence significative ($p < 0.05$), une différence très significative ($p < 0.001$) et une différence extrêmement significative ($p < 0.0001$) entre la valeur des cellules contrôles et celles des cellules transgéniques.



4.1.3.3 Lignées RAR β 4-LIKE

L'analyse par microscopie confocale de l'intensité relative du signal d'immunofluorescence de Hoxa-4 montre une expression modifiée de la protéine Hoxa-4 chez nos souris transgéniques RAR β 4-LIKE. Contrairement à l'expression des protéines Hoxa-1 et Hoxa-2, l'expression de la protéine Hoxa-4 ne change pas lorsque le récepteur RAR β 4-LIKE est sur-exprimé.

Chez les pneumocytes de type II RAR β 4-LIKE, le signal d'immunofluorescence est peu affectée par rapport à celui des pneumocytes de type II non transgéniques (figure 21 A, B et C). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire ont donné des résultats de 52.82 ± 9.16 ($p > 0.05$, $n = 24$) pour les pneumocytes de type II de la lignée 32, de 60.39 ± 14.79 ($p > 0.05$, $n = 25$) pour les pneumocytes de type II de la lignée 5005 et de 61.58 ± 15.34 ($n = 17$) pour les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 22 A). L'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules RAR β 4-LIKE n'est donc pas différente de celle des pneumocytes de type II non transgéniques.

Chez les cellules de Clara RAR β 4-LIKE, le signal d'immunofluorescence est assez similaire entre les lignées transgéniques et les cellules de Clara non transgéniques (figure 21 D, E et F). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire ont donné des résultats de 33.63 ± 4.60 ($p > 0.05$, $n = 15$) pour les cellules de Clara de la lignée 32, de 37.25 ± 8.29 ($p > 0.05$, $n = 15$) pour les cellules de Clara de la lignée 5005 et de 34.49 ± 2.86 ($n = 15$) pour les cellules de Clara non transgéniques

(figure 22 B). L'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules de Clara des RAR β 4-LIKE n'est donc pas différente de celle observée chez les cellules de Clara non transgéniques.

Chez les cellules cancéreuses RAR β 4-LIKE, l'intensité du signal varie beaucoup, mais montre une similitude entre les deux lignées (figure 21 G et H). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence ont donné des résultats de 38.97 ± 9.27 (n = 15) pour la lignée 32 et de 30.77 ± 8.72 (n = 15) pour la lignée 5005. Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II non transgéniques (de 61.58 ± 15.34 , n = 17), ces intensités sont inférieures de 37 % pour la lignée 32 (p < 0.0001) et de 50 % (p < 0.0001) pour la lignée 5005. Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara non transgéniques (de 34.49 ± 2.86 , n = 14), l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses de la lignée 32 est supérieure de 13 % (p < 0.05), tandis que celle des cellules cancéreuses de la lignée 5005 n'est pas différente. Chez les cellules cancéreuses pulmonaires RAR β 4-LIKE, l'expression d'Hoxa-4 est donc affectée d'une légère sous-expression.

Figure 21. Variations d'expression de la protéine Hoxa-4 chez les souris transgéniques RAR β 4-LIKE

L'anticorps anti-Hoxa-4 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules pulmonaires des souris transgéniques des lignées 32 (B, E et G) et 5005 (C, F et H) en parallèle à celles des souris non-transgéniques (A et D). Les cellules pulmonaires observées plus particulièrement sont les pneumocytes de type II (A, B et C), les cellules de Clara (D, E et F) et les cellules tumorales pulmonaires (G et H) d'une même souris transgénique. L'intensité du signal d'immunofluorescence va de 0 à 255 (visuellement, du noir vers le blanc) et est indiquée par l'échelle pseudo-colorée située à droite de la figure. L'échelle de taille dans les panneaux A à H correspond à 10 μ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.

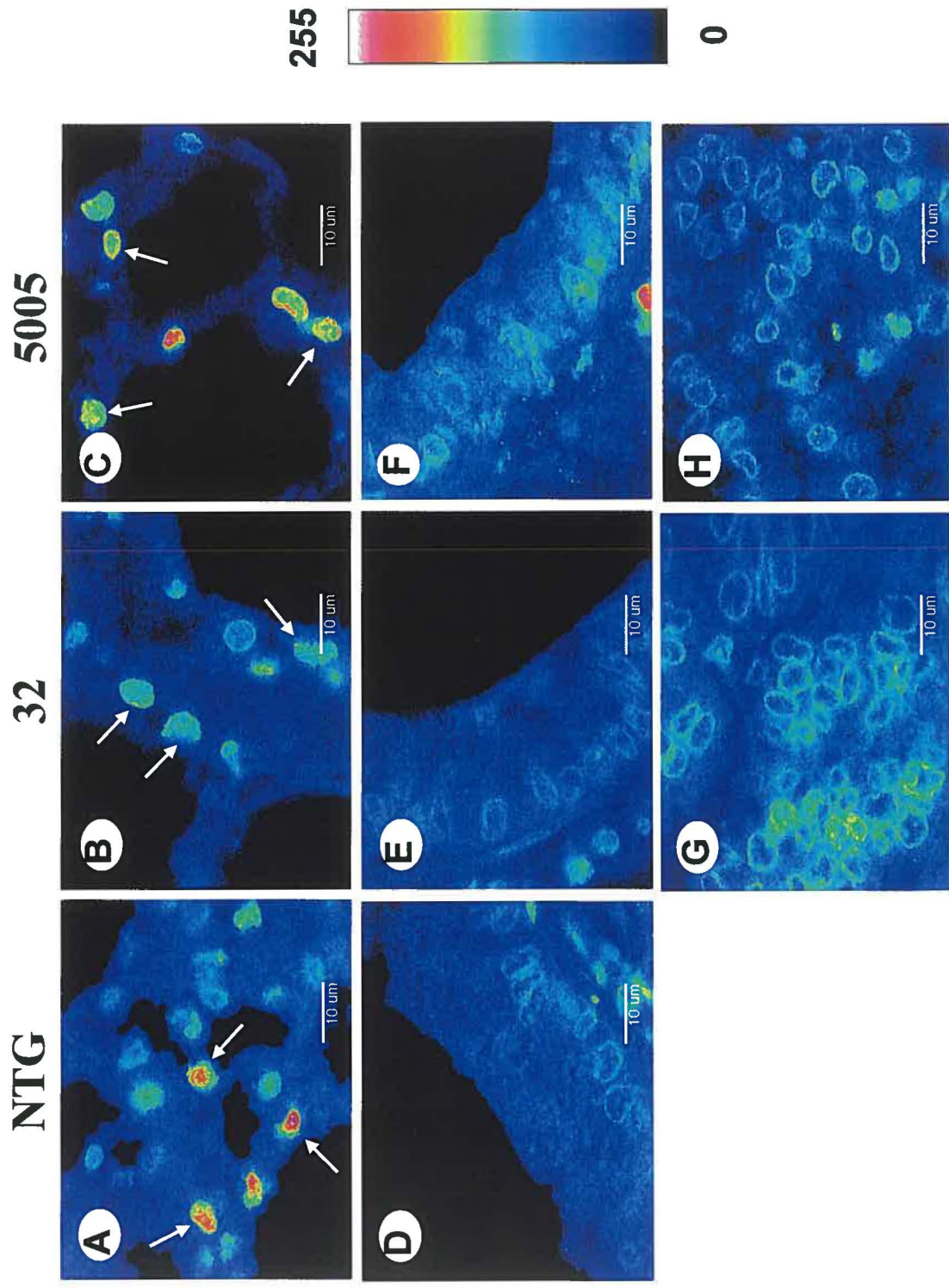
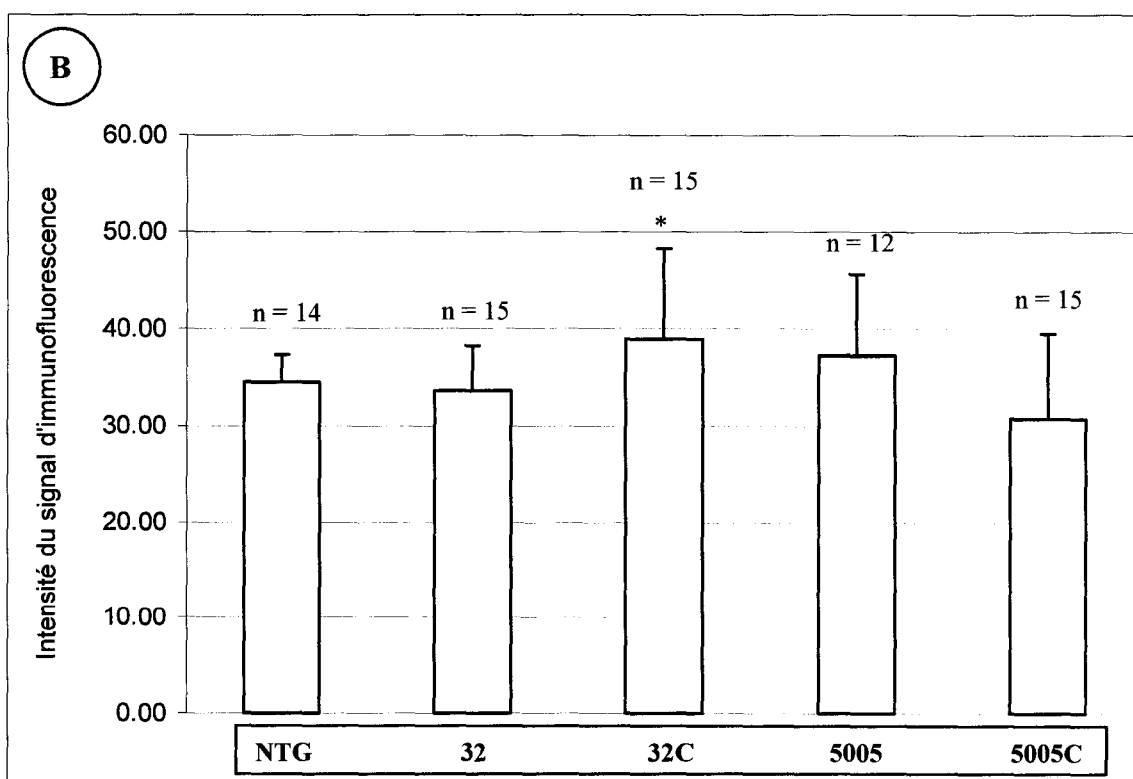
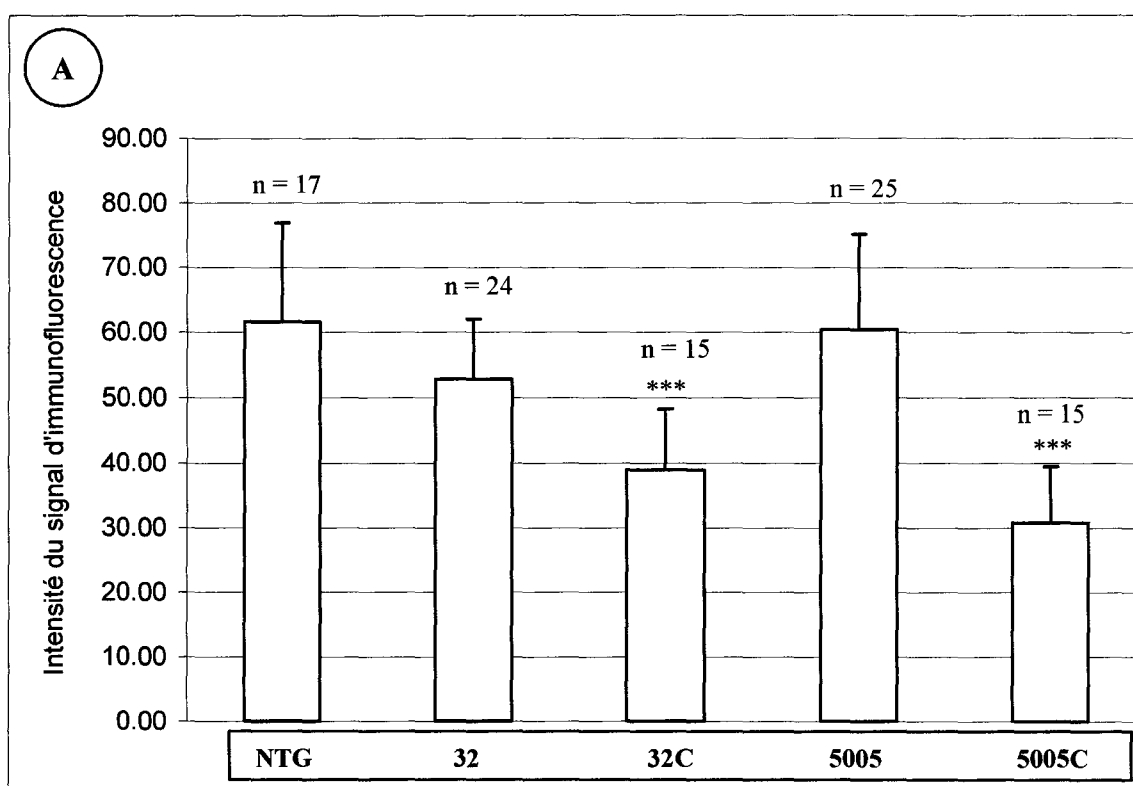


Figure 22. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-4 chez les cellules RAR β 4-LIKE

L'intensité du signal d'immunofluorescence observé chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara a été mesurée par analyse des images obtenues par microscopie confocale avec le logiciel Intervision, version Unix. Ces mesures sont représentées graphiquement par la moyenne établie sur une population de cellules. Une barre d'erreur est indiquée au-dessus des colonnes. Les graphiques regroupent les lignées porteuses de la construction RAR β 4-LIKE. Sur le graphique A, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les pneumocytes de type II non transgéniques et des lignées 32 et 5005 est présentée. Sur le graphique B, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules de Clara non transgéniques et des lignées 32 et 5005 est exposée. L'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses des lignées 32 et 5005 (respectivement 32C, 5005C) a été placée en parallèle avec celles des pneumocytes de type II et des cellules de Clara. Les symboles * et *** indiquent respectivement une différence significative ($p < 0.05$) et une différence extrêmement significative ($p < 0.0001$) entre la valeur des cellules contrôles et celles des cellules transgéniques.



4.1.4 Résultats du marquage contre la protéine Hoxa-5

Le gène *Hoxa-5*, situé en 5' du gène *Hoxa-4* dans le complexe de gènes homéotiques A, est fortement exprimé lors de la formation des poumons (Kim et Nielsen, 2000). De plus, son expression est intimement liée à celle du gène *Hoxa-4* par l'expression en cascade des gènes *HOX* qui a lieu au cours du développement (Ogura et Evans, 1995). Dans la section précédente, nous avons démontré que l'expression de la protéine Hoxa-4 est modifiée surtout chez nos souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3 et AS-RAR β 2. Considérant ces altérations d'expression et l'effet de la protéine Hoxa-4 sur l'expression du gène *Hoxa-5*, l'expression de la protéine Hoxa-5 devrait également être fortement altérée dans les cellules pulmonaires de nos souris transgéniques.

4.1.4.1 Lignées AS-RAR β 1/ β 3

L'analyse par microscopie confocale de l'intensité relative du signal d'immunofluorescence de Hoxa-5 chez nos souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3 montre que la protéine Hoxa-5 est exprimée de manière anormale. Chez ces dernières, la sous-expression des récepteurs RAR β 1 et RAR β 3 affecte à la hausse l'expression de la protéine Hoxa-5.

Chez les pneumocytes de type II AS-RAR β 1/ β 3, le signal d'immunofluorescence augmente en intensité par rapport aux pneumocytes de type II non transgéniques (figure 23 A, B et C). Les mesures de l'intensité cellulaire du signal d'immunofluorescence chez les pneumocytes de type II ASRAR β 1/ β 3 ont donné des résultats de 100.05 ± 17.29 ($p < 0.05$, $n = 5$) pour les pneumocytes de type II de la lignée 1002 et de 90.58 ± 9.25 ($p >$

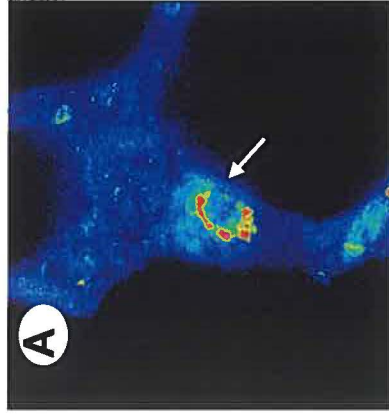
0.05, $n = 3$) pour les pneumocytes de type II de la lignée 1003, par rapport à 79.06 ± 14.25 ($n = 5$) pour les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 24 A). Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II non transgéniques, l'intensité du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II de la lignée 1002 est de ce fait supérieure de 27 %, tandis que celle des pneumocytes de type II de la lignée 1003 n'est pas différente.

Chez les cellules de Clara transgéniques AS-RAR β 1/ β 3, le signal d'immunofluorescence varie en intensité selon la lignée par rapport à celui des cellules de Clara non transgéniques (figure 23 D, E et F). En effet, les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire ont donné des résultats de 111.44 ± 12.32 ($p < 0.05$, $n = 5$) pour les cellules de Clara de la lignée 1002 et de 72.12 ± 7.80 ($p < 0.05$, $n = 5$) pour les cellules de Clara de la lignée 1003, par rapport à 88.61 ± 4.88 ($n = 5$) chez les cellules de Clara non transgéniques (figure 24 B). Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara non transgéniques, l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara de la lignée 1002 est donc supérieure de 26 % et celle des cellules de Clara de la lignée 1003 est inférieure de 19 %.

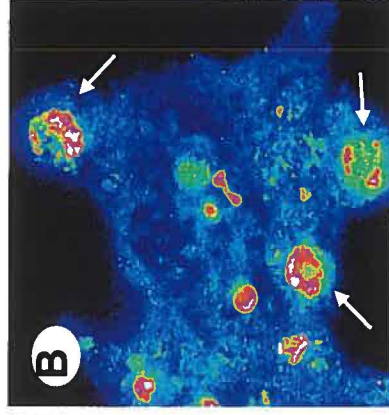
Figure 23. Variations d'expression de la protéine Hoxa-5 chez les souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3

L'anticorps anti-Hoxa-5 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence dans les cellules pulmonaires des souris transgéniques des lignées 32 (B et E) et 5005 (C, et F) en parallèle à celles des souris non-transgéniques (A et D). Les cellules pulmonaires observées plus particulièrement sont les pneumocytes de type II (A, B et C) ainsi que les cellules de Clara (D, E et F) provenant d'une même souris transgénique. L'intensité du signal d'immunofluorescence est indiquée par l'échelle pseudo-colorée qui va de 0 à 255 (visuellement, du noir vers le blanc) située à droite de la figure. L'échelle de taille dans les panneaux A à H correspond à 10 μ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.

NTG



1002



1003

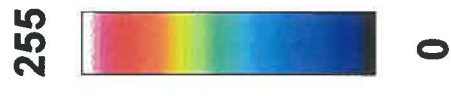
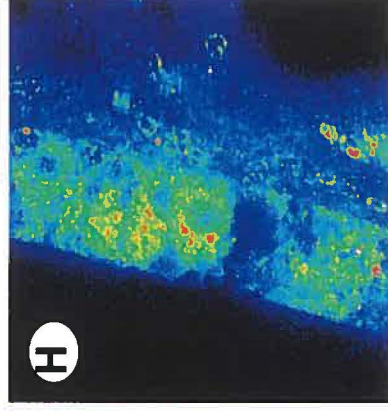
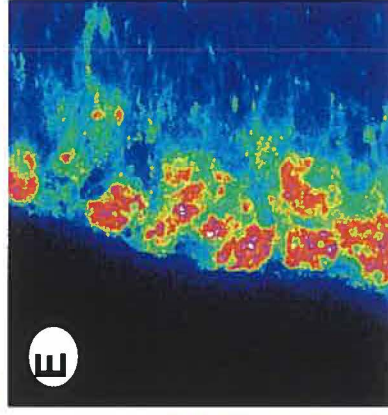
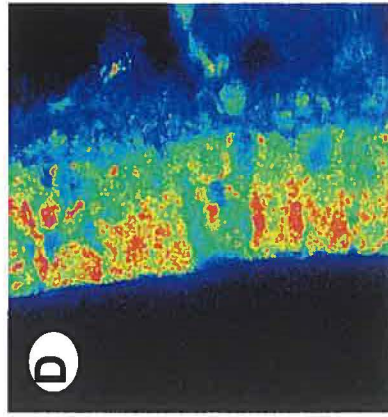
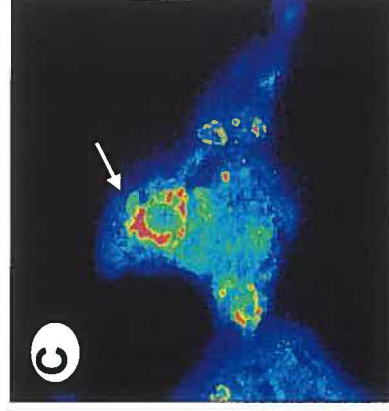
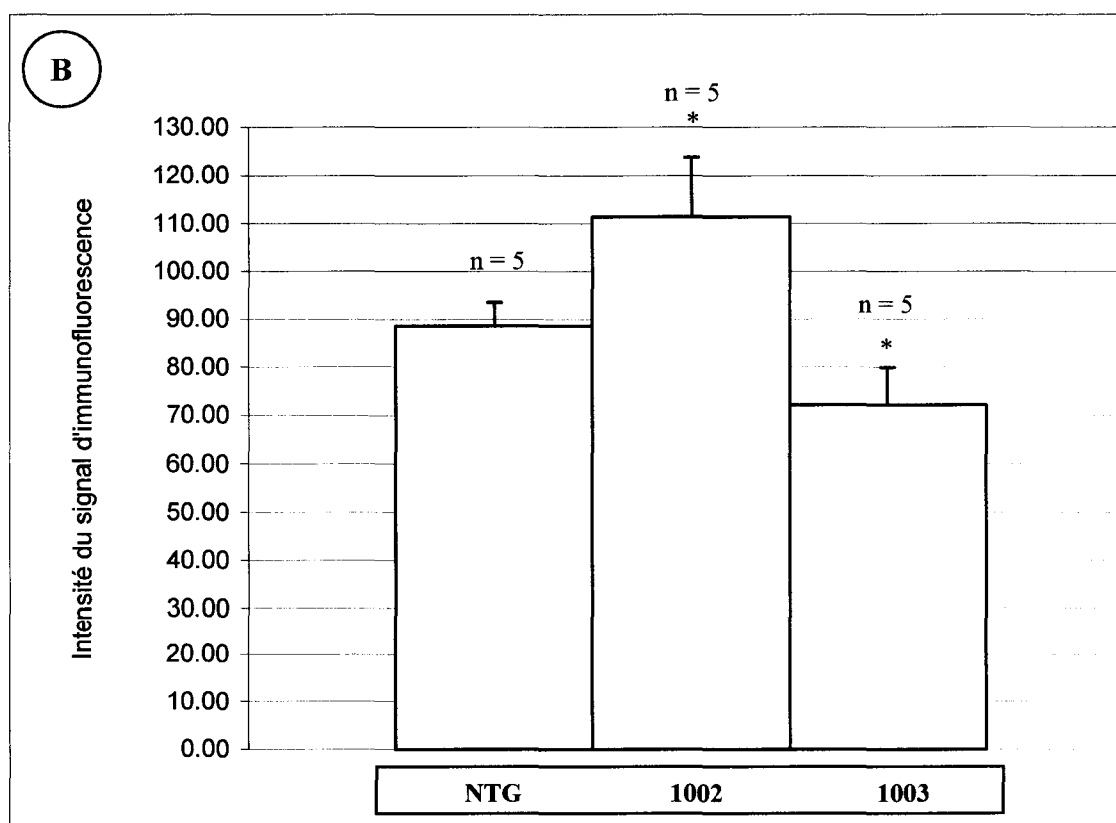
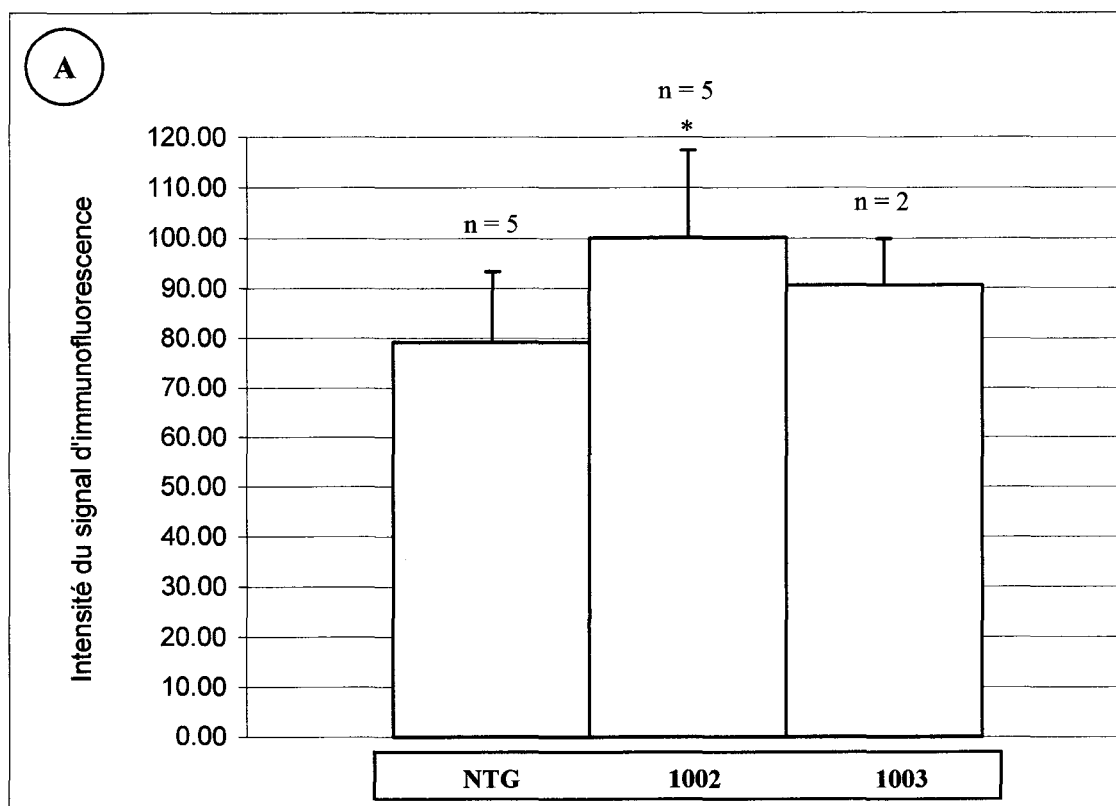


Figure 24. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-5 chez les cellules RAR β 1/ β 3

L'intensité du signal d'immunofluorescence observé chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara a été mesurée par analyse des images obtenues par microscopie confocale avec le logiciel Intervision, version Unix. Ces mesures sont représentées graphiquement par la moyenne établie sur une population de cellules. Une barre d'erreur est indiquée au-dessus des colonnes. Les graphiques regroupent les lignées porteuses de la construction RAR β 1/ β 3. Sur le graphique A, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les pneumocytes de type II non transgéniques et des lignées 1002 et 1003 est présentée. Sur le graphique B, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules de Clara non transgéniques et des lignées 1002 et 1003 est exposée. Le symbole * indique une différence significative ($p < 0.05$) entre la valeur des cellules contrôles et celles des cellules transgéniques.



4.1.4.2 Lignées RAR β 4-LIKE

L'analyse par microscopie confocale de l'intensité relative du signal d'immunofluorescence produit par le marquage contre la protéine Hoxa-5 chez nos souris transgéniques RAR β 4-LIKE a montré l'expression altérée de cette protéine. Chez ces souris, la sur-expression du récepteur RAR β 4-LIKE provoque l'augmentation de l'expression de la protéine Hoxa-5. Suite à cette analyse, un immunobuvardage sur des extraits protéiques totaux d'isolats de pneumocytes de type II a été effectué afin de certifier la présence de la protéine Hoxa-5 chez ces cellules pulmonaires (figure 27).

Chez les pneumocytes de type II RAR β 4-LIKE, le signal d'immunofluorescence est très fort par rapport au signal d'immunofluorescence observé chez les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 25 A, B et C). Les mesures de l'intensité du signal cellulaire ont donné des résultats de 132.18 ± 21.41 ($p < 0.001$, $n = 8$) pour la lignée 32, de 81.23 ± 10.48 ($p < 0.05$, $n = 4$) pour la lignée 5005 et de 58.66 ± 11.93 ($n = 6$) pour les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 26 A). Comparativement à l'intensité du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II non transgéniques, les intensités du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II des lignées 32 et 5005 sont supérieures de 125 % et de 38 % respectivement.

Chez les cellules de Clara RAR β 4-LIKE, le signal d'immunofluorescence est très différent de celui observé chez les cellules de Clara non transgéniques (figure 25 D, E et F). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire ont donné des résultats de 97.04 ± 14.67 ($p < 0.001$, $n = 8$) pour les cellules de Clara de la lignée 32, de

82.66 ± 7.84 ($p < 0.0001$, $n = 8$) pour les cellules de Clara de la lignée 5005 et de 52.20 ± 2.99 ($n = 6$) pour les cellules de Clara non transgéniques (figure 26 B). Par rapport à l'intensité du signal cellulaire des cellules de Clara non transgéniques, les intensités du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara des lignées 32 et 5005 sont respectivement supérieures de 86 et 58 %.

Pour s'assurer de la présence de la protéine Hoxa-5 dans les pneumocytes de type II des lignées transgéniques RAR β 4-LIKE et valider notre anticorps, nous avons effectué un immunobuvardage d'extraits protéiques totaux produits à partir de ces cellules. La pureté de l'isolat de pneumocytes de type II a été déterminée comme étant de 85 % selon des analyses cytométriques associées aux marquages cellulaires spécifiques aux pneumocytes de type II (SP-B) et aux cellules de Clara (CC10) obtenues par la technique du FACS. Sur la figure 27, la protéine Hoxa-5 est présente tant chez les pneumocytes de type II transgéniques des lignées 32 et 5005 que chez les pneumocytes de type II non-transgéniques. La bande protéique caractéristique de Hoxa-5 a un poids approximatif de 35 kDa.

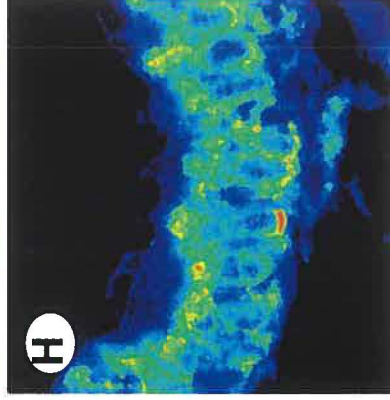
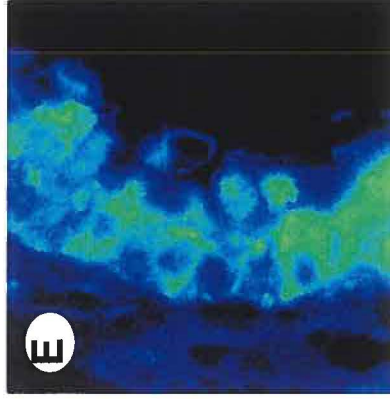
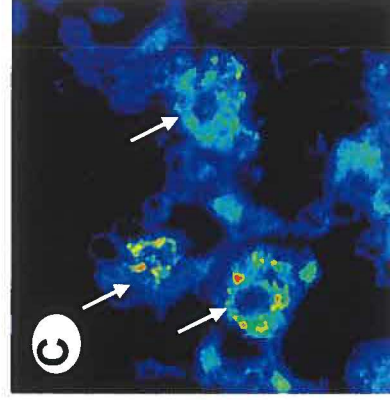
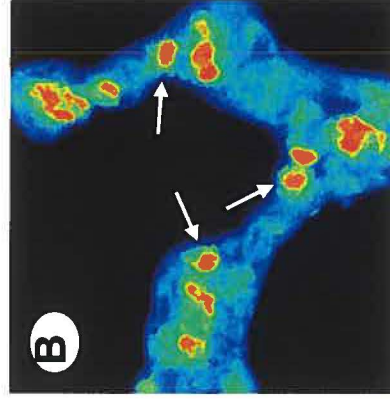
Figure 25. Variations d'expression de Hoxa-5 chez les souris transgéniques RAR β 4-LIKE

L'anticorps anti-Hoxa-5 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules pulmonaires des souris transgéniques des lignées 32 (B, E et G) et 5005 (C, F et H) en parallèle à celles des souris non-transgéniques (A et D). Les cellules pulmonaires observées plus particulièrement sont les pneumocytes de type II (A, B et C), les cellules de Clara (D, E et F) et les cellules tumorales pulmonaires (G et H) provenant d'une même souris transgénique. L'intensité du signal d'immunofluorescence est indiquée par l'échelle pseudo-colorée allant de 0 à 255 (visuellement, du noir vers le blanc) et située à droite de la figure. L'échelle de taille dans les panneaux A à H correspond à 10 μ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.

NTG

32

5005



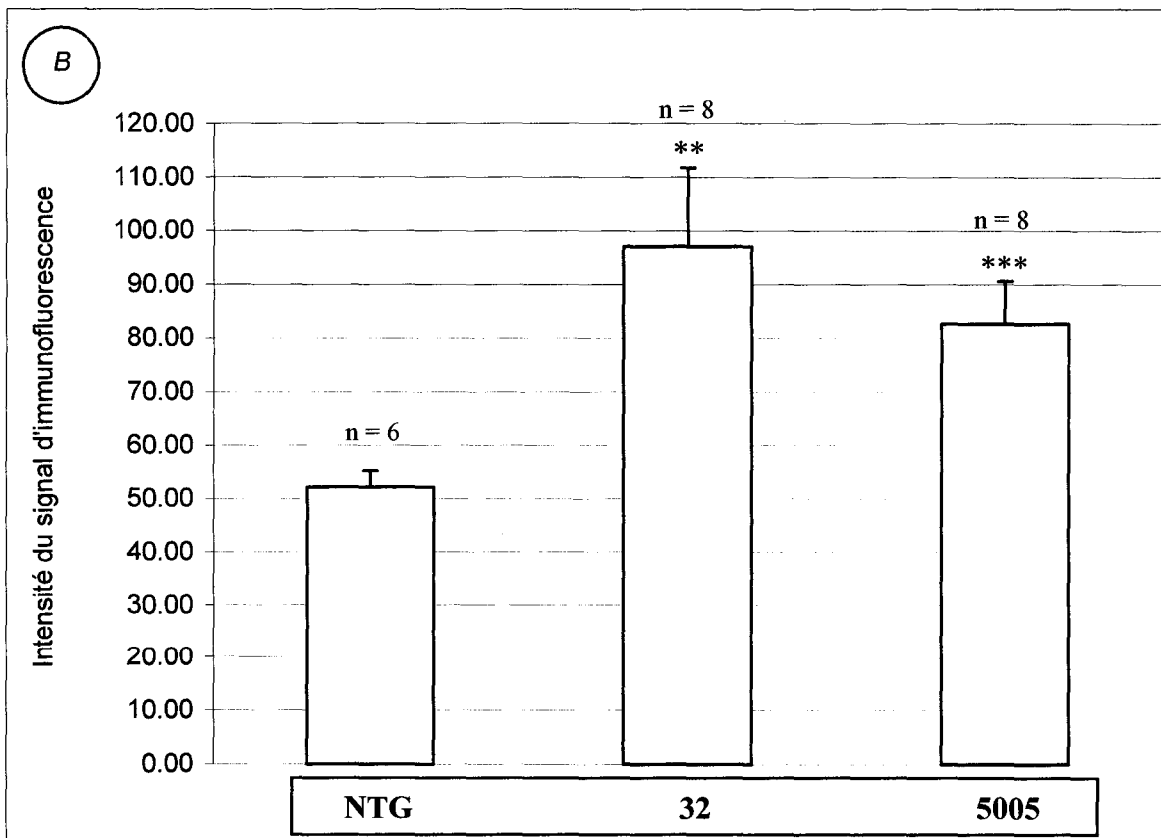
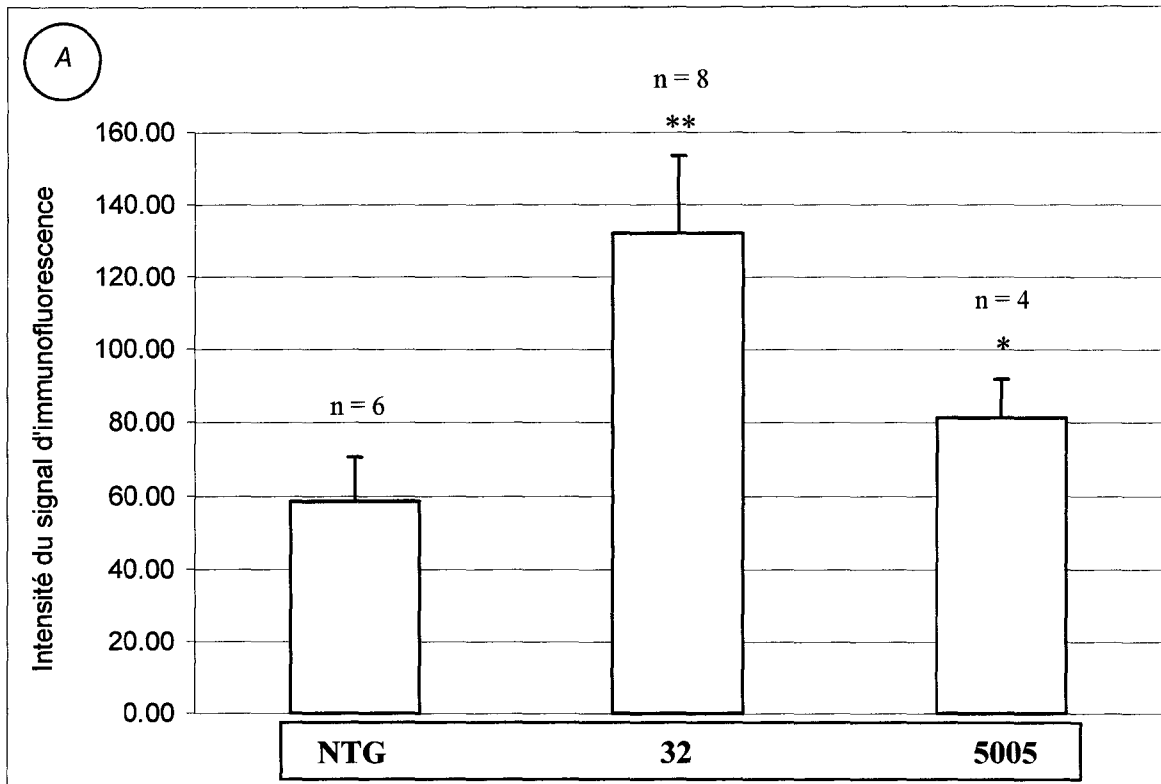
255



0

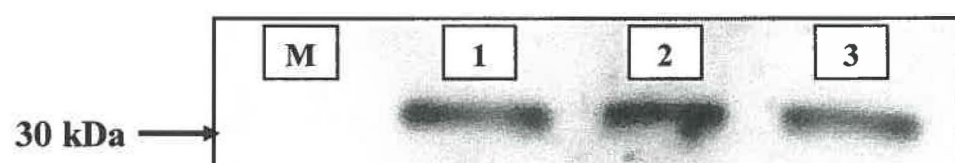
Figure 26. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-5 chez les cellules RAR β 4-LIKE

L'intensité du signal d'immunofluorescence observé chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara a été mesurée par analyse des images obtenues par microscopie confocale avec le logiciel Intervision, version Unix. Ces mesures sont représentées graphiquement par la moyenne établie sur une population de cellules. Une barre d'erreur est indiquée au-dessus des colonnes. Les graphiques regroupent les lignées porteuses de la construction RAR β 4-LIKE. Sur le graphique A, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les pneumocytes de type II non transgéniques et des lignées 32 et 5005 est présentée. Sur le graphique B, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules de Clara non transgéniques et des lignées 32 et 5005 est exposée. Les symboles *, ** et *** indiquent respectivement une différence significative ($p < 0.05$), une différence très significative ($p < 0.001$) et une différence extrêmement significative ($p < 0.0001$) entre la valeur des cellules contrôles et celles des cellules transgéniques.



**Figure 27. Immunobuvardage de Hoxa-5 dans un isolat de pneumocytes de type II
des lignées transgéniques RAR β 4-LIKE**

L'immunobuvardage a été exécuté avec 50 ug d'extrait de protéines totales de pneumocytes de type II non-transgéniques (ligne 1), transgéniques de la lignée 32 (ligne 2) et transgéniques de la lignée 5005 (ligne 3) purs à 85%. Le marqueur de taille (M) indique l'emplacement de la bande de 30 kDa, au-dessus de laquelle on trouve la bande associée à Hoxa-5 d'un poids de 35 kDa approximativement. La révélation des bandes protéiques sur l'immunobavardage a été accomplie par chemiluminescence, selon le protocole mentionné dans la section matériel et méthodes.



4.1.5 Résultats du marquage contre la protéine Hoxa-7

Le gène Hoxa-7 est le gène le plus en 5' du complexe A dont l'expression a été analysée. Vu sa position postérieure dans le complexe et la présence d'un RARE parmi ses séquences régulatrices, il est probable que l'expression altérée des gènes Hoxa-1, Hoxa-2, Hoxa-4 et Hoxa-5 démontrée précédemment modifie son expression via la cascade d'expression des gènes Hox (Kim et al., 1998).

4.1.5.1 Lignée AS-RAR β 1/ β 3

L'analyse d'images obtenue par microscopie confocale a montré une expression différente de la protéine Hoxa-7 chez nos souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3 par rapport à l'expression qui est observée chez nos souris non transgéniques. L'intensité relative du signal d'immunofluorescence d'Hoxa-7 révèle que la sous-expression des récepteurs RAR β 1 et RAR β 3 affecte à la hausse l'expression de la protéine Hoxa-7.

Chez les pneumocytes de type II AS-RAR β 1/ β 3, le signal d'immunofluorescence augmente en intensité par rapport au signal d'immunofluorescence observé chez les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 28 A, B et C). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire chez les pneumocytes de type II des lignées 1002 et 1003 ont donné des résultats de 75.50 ± 17.75 ($p < 0.0001$, $n = 18$) et de 77.18 ± 12.71 ($p < 0.0001$, $n = 18$), par rapport à de 56.26 ± 6.83 ($n = 20$) pour les pneumocytes de type II non transgéniques (figure 29 A). Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II non transgéniques, l'intensité

du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II ASRAR β 1/ β 3 est donc supérieure de 34 % pour la lignée 1002 et de 37 % pour la lignée 1003.

Chez les cellules de Clara ASRAR β 1/ β 3, le signal d'immunofluorescence varie seulement dans une lignée transgénique par rapport aux cellules de Clara non transgéniques (figure 28 D, E et F). Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence cellulaire ont donné des résultats de 82.03 ± 20.65 ($p > 0.05$, $n = 15$) pour la lignée 1002, de 58.73 ± 6.46 ($p < 0.05$, $n = 15$) pour la lignée 1003 et de 78.32 ± 11.40 ($n = 15$) pour les cellules de Clara non transgéniques (figure 29 B). Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara non transgéniques, l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara de la lignée 1002 n'est donc pas différente, au contraire de l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara de la lignée 1003 qui est inférieure de 25 %.

Chez les cellules cancéreuses des lignées 1002 et 1003, le signal d'immunofluorescence est assez similaire. Les mesures de l'intensité du signal d'immunofluorescence ont donné des résultats de 54.95 ± 16.51 ($n = 15$) pour les cellules cancéreuses de la lignée 1002 et de 63.67 ± 17.07 ($n = 15$) pour les cellules cancéreuses de la lignée 1003. Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des pneumocytes de type II non transgéniques (de 56.26 ± 6.83 , $n = 20$), les intensités du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses des lignées 1002 et 1003 ne sont pas différentes. Par rapport à l'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules de Clara non transgéniques (de 78.32 ± 11.40 , $n = 15$), seule l'intensité du signal

d'immunofluorescence des cellules cancéreuses de la lignée 1002 est inférieure de 30 % ($p < 0.001$). L'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses de la lignée 1003 n'est pas différente. Chez les cellules cancéreuses des lignées AS-RAR β 1/ β 3, la protéine Hoxa-7 est donc peu sous-exprimée.

Figure 28. Variations d'expression de Hoxa-7 chez les souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3

L'anticorps anti-Hoxa-7 permet d'évaluer l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules pulmonaires des souris transgéniques des lignées 1002 (B, E et G) et 1003 (C, F et H) en parallèle à celles des souris non-transgéniques (A et D). Les cellules pulmonaires observées plus particulièrement sont les pneumocytes de type II (A, B et C), les cellules de Clara (D, E et F) et les cellules tumorales pulmonaires (G et H) provenant d'une même souris transgéniques. L'intensité du signal d'immunofluorescence est indiquée par l'échelle pseudo-colorée qui va de 0 à 255 (visuellement, du noir vers le blanc) et qui est située à droite de la figure. L'échelle de taille dans les panneaux A à H correspond à 10 μ m. Les pneumocytes de type II sont indiqués par des flèches.

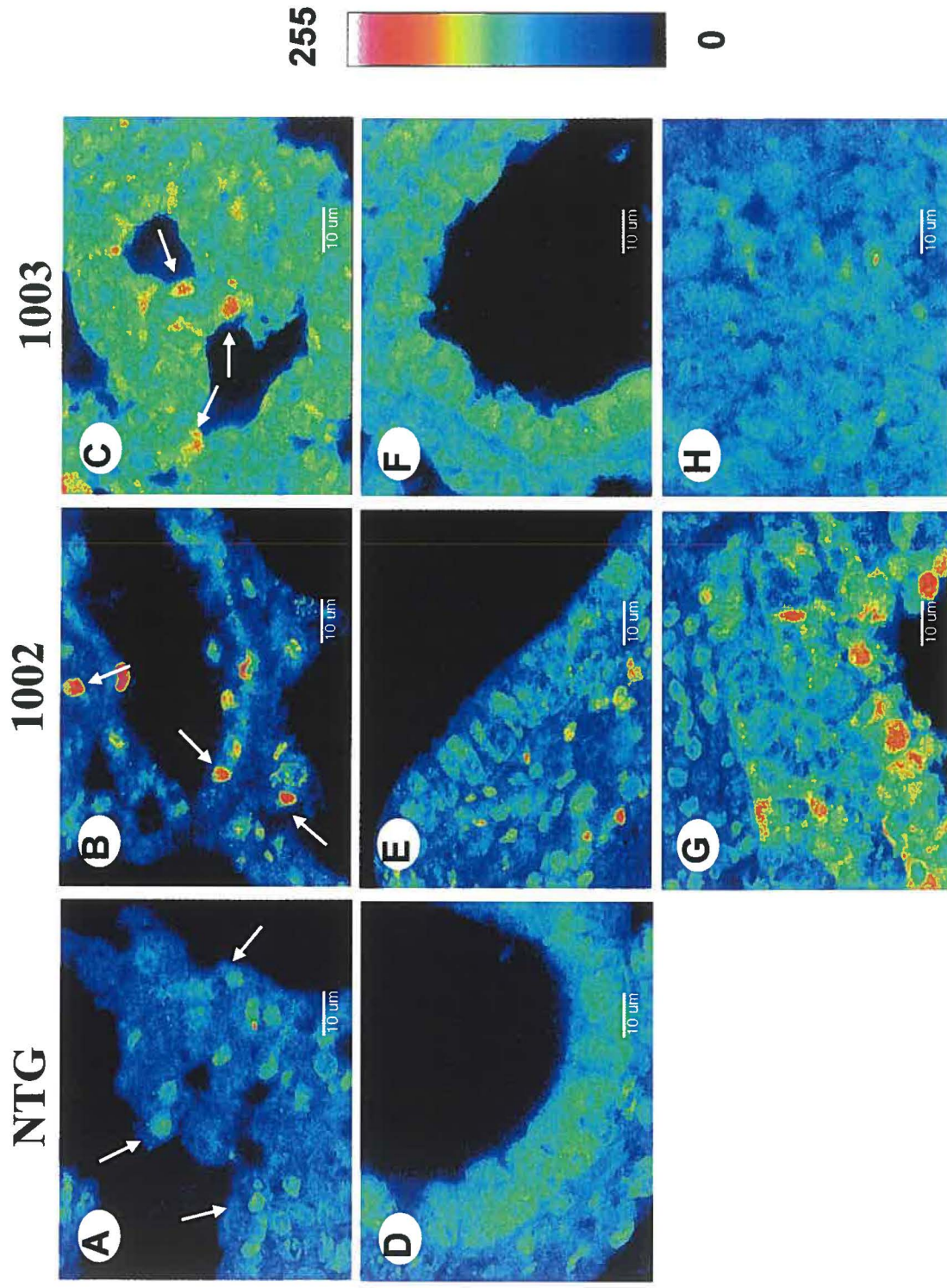
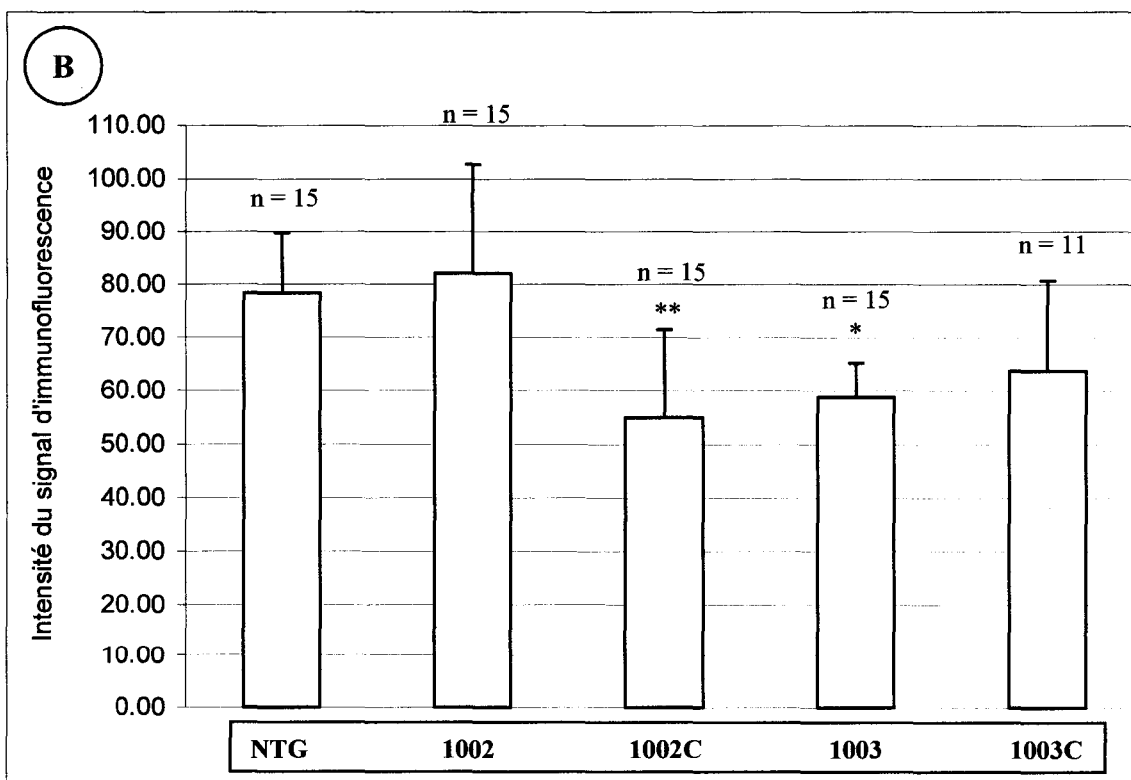
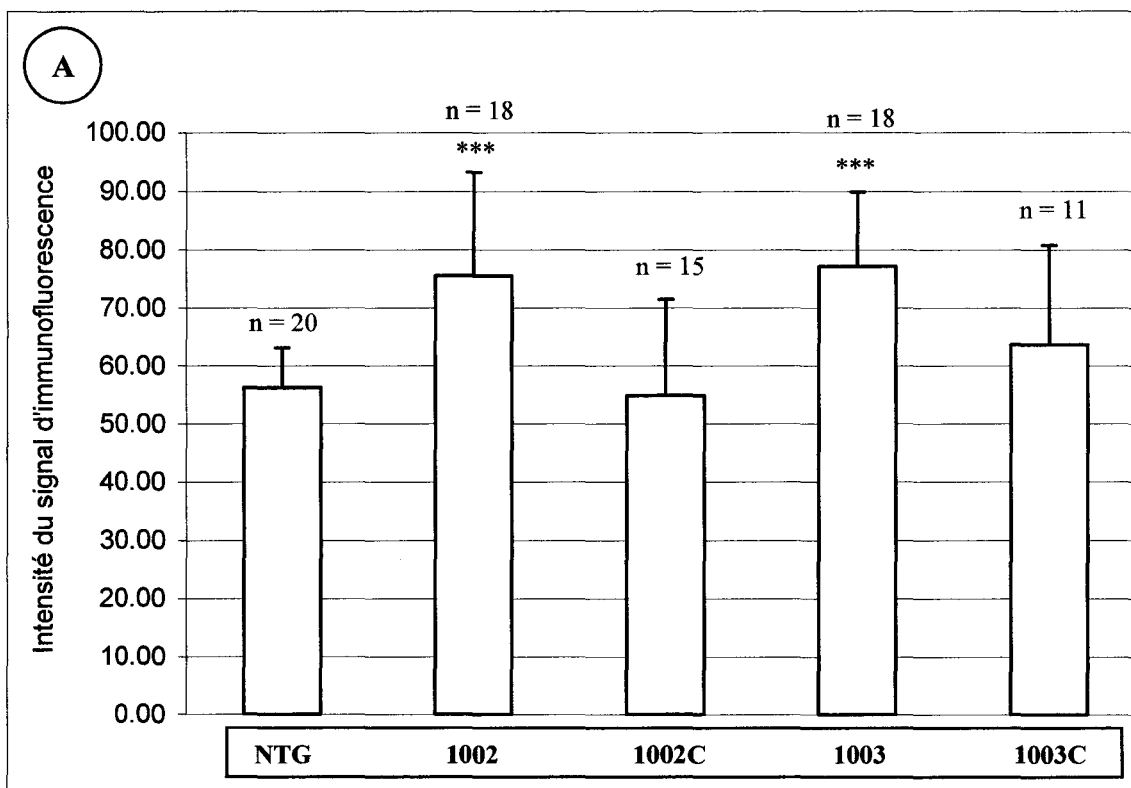


Figure 29. Quantification de la variation d'expression de la protéine Hoxa-7 chez les cellules RAR β 1/ β 3

L'intensité du signal d'immunofluorescence observé chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara a été mesurée par analyse des images obtenues par microscopie confocale avec le logiciel Intervision, version Unix. Ces mesures sont représentées graphiquement par la moyenne établie sur une population de cellules. Une barre d'erreur est indiquée au-dessus des colonnes. Les graphiques regroupent les lignées porteuses de la construction RAR β 1/ β 3. Sur le graphique A, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les pneumocytes de type II non transgéniques et des lignées 1002 et 1003 est présentée. Sur le graphique B, l'intensité du signal d'immunofluorescence chez les cellules de Clara non transgéniques et des lignées 1002 et 1003 est exposée. L'intensité du signal d'immunofluorescence des cellules cancéreuses des lignées 1002 et 1003 (respectivement 1002C et 1003C) a été placée en parallèle avec celles des pneumocytes de type II et des cellules de Clara. Les symboles *, ** et *** indiquent respectivement une différence significative ($p < 0.05$), une différence très significative ($p < 0.001$) et une différence extrêmement significative ($p < 0.0001$) entre la valeur des cellules contrôles et celle des cellules non transgéniques.



5. DISCUSSION

Ce projet de recherche avait pour but premier de démontrer l'hypothèse que l'expression des gènes *Hox* du complexe A est modifiée lorsque l'expression des différents isoformes de RAR β est altérée. Au sein des cellules des organismes vivants, l'expression des gènes *Hox* est finement contrôlée par une autorégulation (Packer et al., 1998; Yau et al., 2002), une régulation trans (Langston et al., 1997; Prince, 2002; Roelen et al., 2002) et une régulation cis effectuée par divers facteurs de transcription tels que Krox20, Pbx et certains récepteurs stéroïdiens-thyroïdiens (Ogura et Evans, 1995; Lufkin 1997; Mark et al., 1997; Kim et al., 1998; Taylor et al., 1998). Parmi les récepteurs stéroïdiens-thyroïdiens impliqués dans la régulation cis des gènes *Hoxa*, on compte notamment les récepteurs nucléaires des acides rétinoïques nommés RAR et RXR (Lufkin, 1997; Taylor et al., 1998; Yau et al., 2002). Au cours du développement embryonnaire, ces récepteurs nucléaires modulent l'expression des gènes *Hox* en liant les RARE situés dans leur promoteur (Ogura et Evans, 1995; Langston et al., 1997; Mark et al., 1997; Packer et al., 1998; Prince, 2002; Roelen et al., 2002). Dans le complexe de gènes *Hoxa*, trois RARE ont été découverts. Ces RARE sont situés dans le promoteur des gènes *Hoxa-1*, *Hoxa-4* et *Hoxa-9* (Dupe et al., 1997; Kim et al., 1998; Packer et al., 1998). Si l'expression des récepteurs nucléaires RAR est modifiée, l'expression des gènes *Hoxa* est donc fortement susceptible d'être aussi altérée.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé trois modèles de souris transgéniques présentant une expression réduite ou aberrante des différentes isoformes du récepteur nucléaire RAR β . Les deux premiers modèles de souris transgéniques utilisés sous-expriment les isoformes RAR β 1 et RAR β 3 ou RAR β 2 via l'expression d'ARN

antisens transcrits à partir des transgènes dirigés contre l'ARNm des récepteurs RAR β 1 et RAR β 3 (le transgène AS-RAR β 1/ β 3; Bérard et al., 1997) et contre l'ARNm du récepteur RAR β 2 (le transgène AS-RAR β 2; Bérard et al., 1996). La liaison des ARN antisens se fait au niveau du site d'initiation de la traduction, de façon à diminuer d'une part la quantité de récepteurs RAR β 1 et RAR β 3 et, d'autre part, la quantité de récepteurs RAR β 2 présents dans les cellules (Bérard et al., 1996, 1997). Chez les lignées de souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3 et AS-RAR β 2, la perte d'expression des isoformes de RAR β reproduit *in vivo* la perte d'expression de ces récepteurs remarquée chez plusieurs tumeurs pulmonaires humaines (Gebert et al., 1991; Bérard et al., 1996, 1997). Le dernier modèle de souris transgéniques utilisé, soit les souris transgéniques RAR β 4-LIKE, sur-exprime l'isoforme RAR β 4 via le transgène RAR β 4-LIKE (Bérard et al., 1994). Chez les souris transgéniques des lignées RAR β 4-LIKE, l'isoforme RAR β 4 est anormalement abondant tel que chez les adénocarcinomes humains (Bérard et al., 1994; Giguère, 1994). Fait intéressant, les souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE présentent une incidence élevée d'apparition spontanée de tumeurs pulmonaires (Bérard et al., 1994, 1996, 1997) qui possèdent des caractéristiques morphologiques, histologiques et biochimiques d'adénocarcinomes pulmonaires (Malkinson, 1992; Bérard et al., 1994, 1996; Malkinson, 2001). À partir de ces modèles animaux, l'influence de la variation de l'expression des récepteurs nucléaires RAR β sur l'expression des gènes dans les cellules pulmonaires peut être déterminée et éventuellement, l'implication de ceux-ci dans l'oncogenèse pourra être débusquée.

Pour déterminer le niveau d'expression des protéines Hoxa-1, Hoxa-2, Hoxa-4, Hoxa-5 et Hoxa-7, des marquages indirects d'immunofluorescence sur des coupes de poumons provenant des souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE ont été effectués. C'est sur les pneumocytes de type II et les cellules de Clara, deux types de cellules pulmonaires à l'origine d'un grand nombre de cancers pulmonaires humains (Gazdar et al., 1983, 1990; Thaete et Malkinson, 1991), ainsi que sur les cellules cancéreuses de tumeurs pulmonaires provenant des même animaux, que nous avons concentré notre attention. Ces cellules pulmonaires ont été identifiées d'après leur tendance à se regrouper, leur localisation, ainsi que par leur forme. Les signaux d'immunofluorescence visibles sur les images obtenues par microscopie confocale ont été analysés par la détermination du nombre moyen de pixels enregistrés, la compilation des résultats et la réalisation de calculs statistiques.

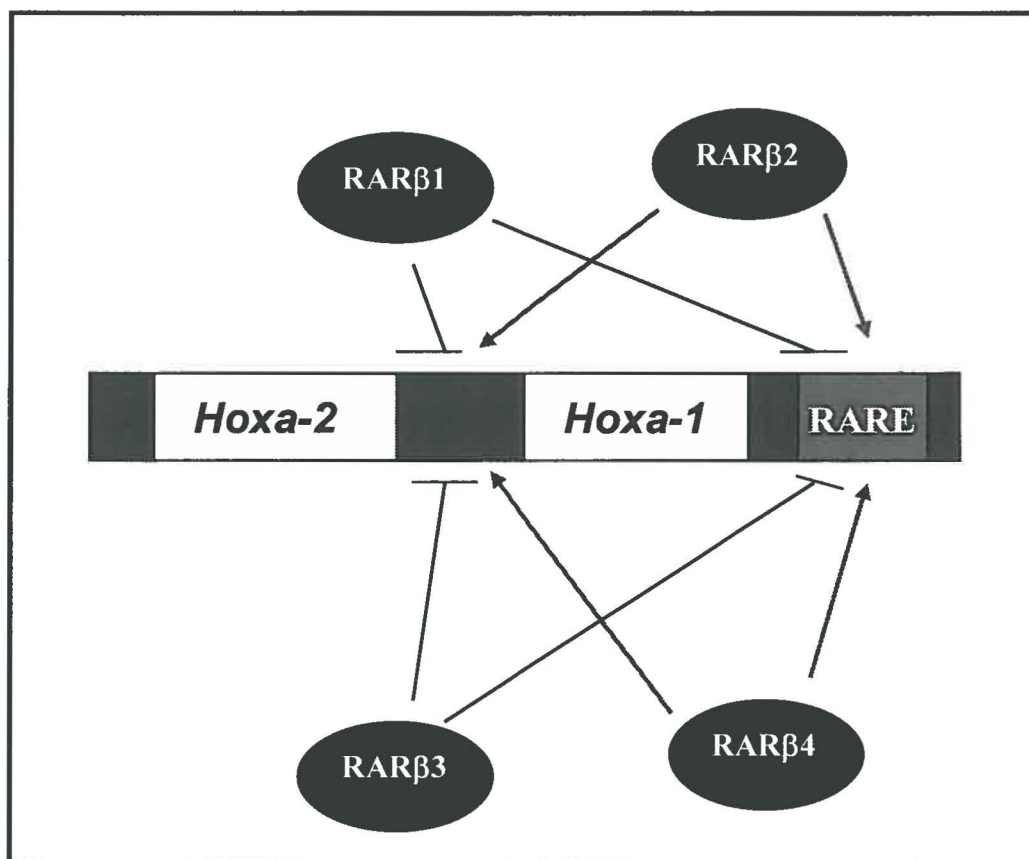
L'expression de la protéine Hoxa-1 semble augmenter chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara des souris transgéniques RAR β 4-LIKE. Les niveaux d'expression de Hoxa-1 significativement différents entre les lignées 32 et 5005 pourraient dépendre des niveaux d'expression variables du récepteur RAR β 4 chez ces lignées, puisque la lignée 32 possède 10 copies du transgène RAR β 4-LIKE, comparativement à une seule copie présente chez les cellules de la lignée 5005 (Bérard et al., 1994). Dans ces conditions, de hauts niveaux de l'isoforme RAR β 4 pourraient monopoliser les éléments de réponse aux acides rétinoïques et par le fait même activer l'expression du gène Hoxa-1. Éventuellement, la détermination du niveau d'expression protéique réel du récepteur RAR β 4 dans les lignées de souris transgéniques RAR β 4-

LIKE permettrait de valider nos hypothèses expliquant la différence d'expression de la protéine Hoxa-1 entre les lignées 32 et 5005. La protéine Hoxa-1 semble également changer de localisation cellulaire dans les pneumocytes de type II et les cellules de Clara RAR β 4-LIKE. Cette seconde variation d'expression reste à confirmer par immunobuvardage d'extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques de ces cellules transgéniques.

La protéine Hoxa-2 est sur-exprimée chez les pneumocytes de type II et chez les cellules de Clara des lignées de souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3 et RAR β 4-LIKE. Chez les souris AS-RAR β 1/ β 3, l'expression de la protéine Hoxa-2 est constamment plus forte chez les cellules de la lignée 1003 que chez celles de la lignée 1002. Une possibilité est que le transgène AS-RAR β 1/ β 3 est plus faiblement exprimé chez les souris transgéniques de la lignée 1002, qui ne possède qu'une seule copie du transgène par rapport à deux chez les souris transgéniques de la lignée 1003 (Bérard et al., 1997). De plus, la protéine Hoxa-2 peut être exprimée fortement dans ces souris à cause d'une sur-expression de l'isoforme RAR β 2 endogène (plus importante chez la lignée 1003) et d'une réduction d'environ 50 % de l'expression de l'isoforme RAR β 4 (Bellehumeur et al., en préparation). Les niveaux réels d'expression de la protéine Hoxa-2 et des isoformes de RAR β restent à être déterminés. Contrairement aux souris AS-RAR β 1/ β 3 et RAR β 4-LIKE, les souris AS-RAR β 2 montrent une sous-expression de Hoxa-2 dans les cellules de Clara et les pneumocytes de type II. Donc, l'expression du gène *Hoxa-2* serait inhibée par les récepteurs nucléaires RAR β 1 et RAR β 3 et activée par les récep-

Figure 30. Modèle d'action des différents récepteurs nucléaires RAR β sur la transcription du gène *Hoxa-2*.

Les isoformes RAR β 1 et RAR β 3 auraient un effet négatif sur la transcription du gène *Hoxa-2* (représenté par une longue ligne perpendiculaire à une ligne plus courte), alors que les isoformes RAR β 2 et RAR β 4-LIKE auraient un effet positif sur la transcription du gène *Hoxa-2* (indiqué par les flèches).

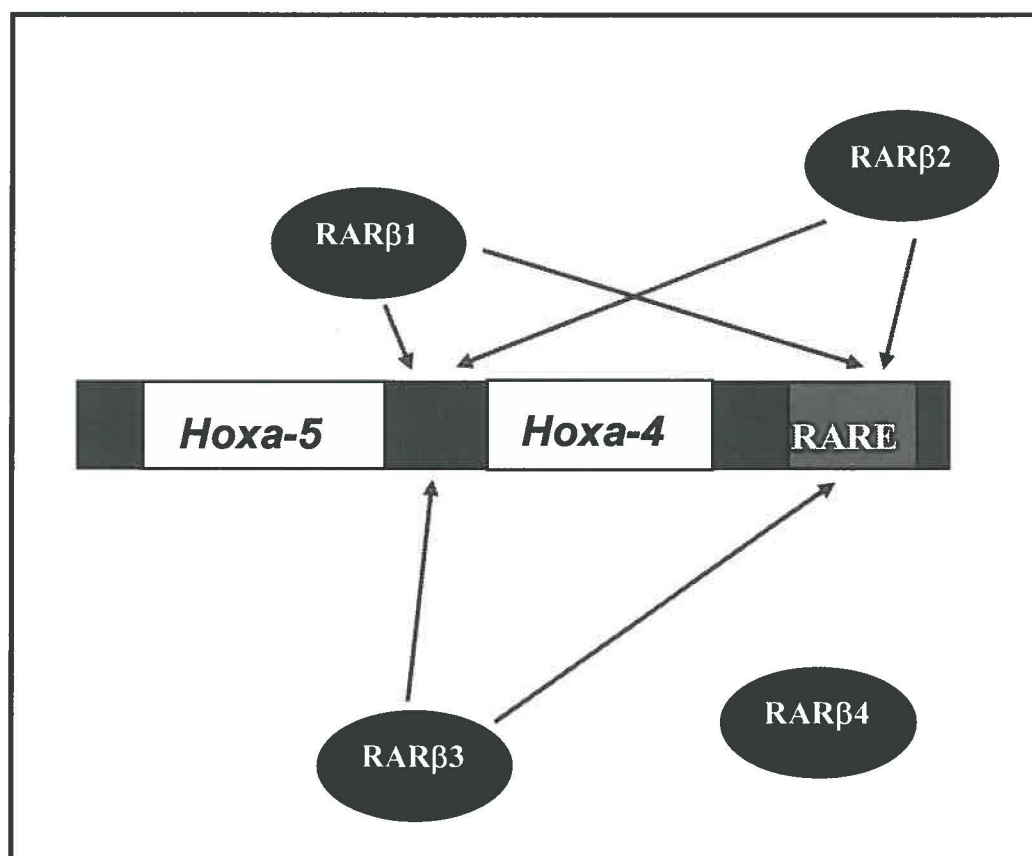


teurs RAR β 2 et RAR β 4 (figure 30). L'inhibition de l'expression du gène *Hoxa-2* pourrait s'effectuer au niveau du RARE (Dupe et al., 1997) ou du site de liaison du facteur de transcription Krox-20 (Nonchev et al., 1996). La protéine Hoxa-2 semble également changer de localisation cellulaire dans les cellules de Clara des différentes lignées transgéniques. Cette seconde variation d'expression reste à confirmer par immunobuvardage d'extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques de cellules de Clara transgéniques.

La protéine Hoxa-4 tend à être sous-exprimée faiblement chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara AS-RAR β 1/ β 3. Des différences existent entre les lignées puisque chez les pneumocytes de type II de la lignée 1002, la protéine Hoxa-4 est sur-exprimée. Les raisons associées à cette différence sont indéterminées. Chez les souris AS-RAR β 2, la protéine Hoxa-4 est légèrement sur-exprimée chez les cellules de Clara AS-RAR β 2 des lignées 422 et 426, alors qu'elle tend à être sous-exprimée chez les pneumocytes de type II et chez les cellules de Clara de la lignée 432. Les raisons associées à ces différences restent également à déterminer. Aucun effet de la surexpression de RAR β 4 n'est observé sur les niveaux de la protéine Hoxa-4. Donc, l'expression de la protéine Hoxa-4 chez nos trois modèles de souris transgéniques présentant des altérations d'expression des différents isoformes de RAR β nous porte à croire que l'expression du gène *Hoxa-4* pourrait être stimulée par les récepteurs RAR β 1, RAR β 2 et RAR β 3, sans effet du récepteur RAR β 4 (figure 31). La protéine Hoxa-4 semble également changer de localisation cellulaire dans les cellules de Clara.

Figure 31. Modèle d'action des différents récepteurs nucléaires RAR β sur la transcription du gène *Hoxa-4*.

Les isoformes RAR β 1, RAR β 2 et RAR β 3 moduleraient positivement l'expression du gène *Hoxa-4* (représentés par une flèche), alors que l'isoforme RAR β 4-LIKE aurait peu ou pas d'effet sur l'expression du gène *Hoxa-4* (sans ligne ni flèche).



Cette seconde variation d'expression reste à confirmer par immunobuvardage d'extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques de cellules de Clara transgéniques.

La protéine Hoxa-5 tend à être sur-exprimée chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara AS-RAR β 1/ β 3 et RAR β 4-LIKE par rapport aux mêmes cellules pulmonaires non transgéniques. La sur-expression de Hoxa-5 est plus marquée chez les cellules de la lignée 32 que celles de la lignée 5005, de manière proportionnelle à l'expression du transgène RAR β 4-LIKE (Bérard et al., 1994). La protéine Hoxa-1 semble également changer de localisation cellulaire dans les pneumocytes de type II et les cellules de Clara RAR β 4-LIKE. Cette seconde variation d'expression reste à confirmer par immunobuvardage d'extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques de pneumocytes de type II et les cellules de Clara RAR β 4-LIKE. Nos travaux ont confirmé l'expression de la protéine Hoxa-5 chez les pneumocytes de type II RAR β 4-LIKE et chez les pneumocytes de type II non transgéniques par immunobuvardage d'extraits de protéines totales produits à partir d'extraits cellulaires purifiées contenant 70 % de pneumocytes de type II non transgéniques et transgéniques RAR β 4-LIKE. Il nous reste à déterminer si le niveau d'expression de la protéine Hoxa-5 est vraiment augmenté chez les souris transgéniques, en utilisant un contrôle de la quantité relative des protéines déposée dans chaque puits.

La protéine Hoxa-7 semble être sur-exprimée chez les pneumocytes de type II AS-RAR β 1/ β 3, alors qu'elle est sous-exprimée chez les cellules de Clara AS-RAR β 1/ β 3 de la lignée 1003. La protéine Hoxa-7 semble également changer de localisation cellulaire

dans les cellules de Clara AS-RAR β 1/ β 3. Cette seconde variation d'expression reste à confirmer par immunobuvardage d'extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques de cellules de Clara AS-RAR β 1/ β 3.

Globalement, nos résultats de l'analyse de l'expression des protéines Hoxa-1, Hoxa-2, Hoxa-4, Hoxa-5 et Hoxa-7 montrent que l'expression des gènes *Hoxa* est altérée positivement ou négativement par des modifications des niveaux d'expression des différents isoformes du récepteur RAR β . Les récepteurs RAR β 1 et RAR β 3 pourraient restreindre l'expression des gènes *Hoxa-2*, *Hoxa-5* et *Hoxa-7*, alors qu'ils pourraient augmenter l'expression du gène *Hoxa-4*. Pour sa part, le récepteur RAR β 2 pourrait stimuler l'expression des gènes *Hoxa-2* et *Hoxa-4*. Enfin, le récepteur RAR β 4 favoriserait la sur-expression de tous les gènes *Hoxa*. Les récepteurs RAR β sont généralement considérés comme régulateurs négatifs de l'expression de gènes en relation avec le cycle cellulaire. En absence de RA, es récepteurs RAR β modulent à la baisse l'expression des gènes c-MYC, FOG1, GATA6, de l'enzyme glutamate déshydrogénase, de l'homologue de la glutathione S-transférase (p28), et du récepteur PDGF-alpha (Faria et al., 1999; Geisen et al., 2000; Zhuang et al., 2003). Selon nos résultats, les isoformes RAR β 1 et RAR β 3 se comporteraient comme des régulateurs négatifs de l'expression des gènes *Hoxa*, contrairement aux isoformes RAR β 2 et RAR β 4, La transactivation variable des gènes *Hoxa* par ces deux derniers isoformes pourrait être causée par une structure tridimensionnelle particulière qui empêche sa liaison aux co-répresseurs et favorise la transactivation génique spécifique de certains gènes (Hauksdottir et al., 2003). Selon Farboud et al. (2003), cette structure serait influencée par de petites séquences d'acides

aminés incluses dans le site de liaison aux RA spécifiques à chacun des isoformes de RAR β . Les hypothèses avancées par les groupes d'Hauksdottir et al. (2003) et de Farboud et al. (2003) ne permettent pas d'expliquer pourquoi le gène *Hoxa-4* est le seul régulé positivement par les récepteurs RAR β 1 et RAR β 3. D'autres études devront être effectuées pour élucider ces mystères. D'autre part, nous suggérons que le récepteur RAR β 4 est capable de transactiver la plupart des gènes *Hoxa*. Cette capacité est intrigante lorsqu'on considère que cet isoforme est dominant négatif à cause de l'absence d'un domaine de transactivation indépendant de la présence des RA (Sommer et al., 1999; Soprano et al., 2000). L'isoforme RAR β 4, sur-exprimé chez les souris RAR β 4-LIKE, pourrait transactiver d'une manière différente l'expression de gènes contenant des éléments de réponse aux RA (Bérard et al., 1994; Soprano et al., 2000). En effet, une sur-expression de l'isoforme RAR β 4 pourrait mener à une compétition entre les isoformes de RAR β : la quantité accrue de RAR β 4 sur les éléments de réponse aux RA pourrait modifier la transactivation des gènes (Bérard et al., 1994). Cette hypothèse reste à confirmer par des expériences mesurant l'affinité de liaison des isoformes du récepteur RAR β aux différents types de RARE en présence d'une augmentation de l'isoforme RAR β 4.

Les protéines homéotiques sont potentiellement impliquées dans l'oncogenèse pulmonaire, particulièrement au niveau de la prolifération et de la différenciation des cellules pulmonaires (Tiberio et al., 1994; Cillo et al., 1999; Bromleigh et Freedman, 2000; Golpon et al., 2001; Sharpless et DePinho, 2002). De plus, l'expression des gènes *HOX* est modifiée chez les cellules cancéreuses de plusieurs types de cancers pulmonaires

humains (De Vita et al., 1993; Cillo, 1994; Flagiello et al., 1997; Vider et al., 2000; Lechner et al., 2002), comme observé chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE.

Nous rapportons des variations d'expression des protéines Hoxa-1, Hoxa-2, Hoxa-4 et Hoxa-7 chez les cellules cancéreuses pulmonaires AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE. Nous avons observé que la protéine Hoxa-1 est sur-exprimée chez les cellules cancéreuses RAR β 4-LIKE de la lignée 32 contrairement à celles de la lignée 5005. Cette différence d'expression est difficilement explicable puisque la protéine Hoxa-1 est augmentée à la fois chez les pneumocytes de type II et les cellules de Clara présents dans les poumons des deux lignées transgéniques. La protéine Hoxa-2, pour sa part, est sur-exprimée chez les cellules cancéreuses de la lignée AS-RAR β 1/ β 3 1003 et chez les cellules cancéreuses des lignées RAR β 4-LIKE. Chez les cellules cancéreuses des lignées de souris transgéniques AS-RAR β 2, la protéine Hoxa-2 est sous-exprimée par rapport aux pneumocytes de type II et aux cellules de Clara non transgéniques, contrairement à ce qui est observé chez les cellules cancéreuses des lignées AS-RAR β 1/ β 3 et RAR β 4-LIKE. La protéine Hoxa-4 est surtout sous-exprimée chez les cellules cancéreuses des lignées de souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE. Enfin, l'expression de la protéine Hoxa-7 chez les cellules cancéreuses AS-RAR β 1/ β 3 est peu modifiée par rapport à celle observée chez les pneumocytes de type II non transgéniques. Chez ces cellules cancéreuses, une baisse d'expression de la protéine Hoxa-7 est observée lorsque les niveaux d'expression sont comparés avec ceux des cellules de Clara non transgéniques.

L'expression des gènes homéotiques du complexe A semble donc modifiée dans les cellules tumorales de nos modèles de souris transgéniques manifestant un dérèglement de l'expression de RAR β . Dans certains cas, nous remarquons une perte d'expression des gènes *Hoxa* dans les tumeurs provenant de souris transgéniques (par exemple *Hoxa-2* chez les souris transgéniques AS-RAR β 2). Dans d'autres, nous remarquons un gain d'expression des gènes *Hoxa* (par exemple *Hoxa-2* chez les souris RAR β 4-LIKE). Parfois, les variations d'expression des gènes homéotiques dans les cellules cancéreuses concordent avec les variations d'expression observées dans les cellules transgéniques normales. Une étude des marqueurs spécifiques des cellules cancéreuses observées permettrait d'établir une filiation cellulaire plus claire avec les pneumocytes de type II ou les cellules de Clara afin de pouvoir comparer les cellules cancéreuses avec leur type cellulaire originel. Ainsi, le risque d'établir de fausses interprétations entre les cellules tumorales et tissulaires pulmonaires serait grandement diminué. Les mécanismes impliqués dans les variations d'expression des gènes *Hoxa* dans les tumeurs pulmonaires en comparaison avec les cellules du tissu pulmonaire restent inconnus. Selon la littérature, l'altération de l'expression des récepteurs RAR serait un facteur initiateur du processus d'oncogenèse chez les cellules normales (de Luca, 1991; Zhang et al., 1996; Hurst et al., 1999; Kang et al., 2000). Une fois enclenché, le processus d'oncogenèse entraîne plusieurs modifications au niveau de l'ADN cellulaire comme la méthylation aberrante des promoteurs de différents gènes, une acétylation anormale des histones entourant l'ADN et finalement des fusions entre certains gènes (Salgia et Skarin, 1998; Goodman et Scambler, 2000; Niklinska et al., 2001). Les gènes *Hoxa* sont affectés par ces modifications (Chariot et al., 1999; Fujino et al., 2002; Shiraishi et al., 2002; Takeneti et

al., 2002; Hershko et al., 2003), et l'expression des gènes *Hoxa* dans les tumeurs des souris transgéniques pourrait être modulée par celles-ci en plus d'être affectée par des modifications de l'expression des isoformes de RAR β . L'ensemble des variations subies par les gènes homéotiques dans les cellules cancéreuses pourrait donc être le résultat de l'amplification des variations de l'expression des gènes *Hoxa* observée chez les lignées AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE.

Nos résultats sur la dérégulation des gènes *Hox* ne nous permettent pas de tirer des conclusions quant à leurs rôles dans l'oncogenèse pulmonaire. Toutefois, deux hypothèses peuvent être émises à ce sujet : la dérégulation des gènes *Hox* pourrait participer activement à l'oncogenèse ou jouerait un rôle protecteur en ralentissant le processus d'oncogenèse. La première hypothèse est supportée par plusieurs résultats qui suggèrent que les gènes *Hox* participent activement dans l'oncogenèse pulmonaire. Les protéines homéotiques influencent plusieurs processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation cellulaires (Rosen et al., 1996), l'apoptose (Izon et al., 1998; Su et al., 2001) et l'angiogenèse (Soncin et al., 1999). De plus, de nombreuses équipes de recherche ont démontré le caractère oncogénique de plusieurs gènes homéotiques tels que *Hoxa-1*, *Hoxa-5*, *Hoxa-7*, *Hoxa-9*, *Hoxb-4* et *Hoxb-8* (Perkins et al., 1990; Aberdam et al., 1991; Maulbecker et Gruss, 1993; Perkins et Cory, 1993; Thorsteinsdottir et al., 2001; Krosi et Sauvageau, 2000). Les gènes *Hoxa-1*, *Hoxa-5*, *Hoxa-7*, *Hoxa-9*, *Hoxb-7* et *Hoxc-8* transforment des fibroblastes lorsque surexprimés (Maulbecker et Gruss, 1993). La seconde hypothèse, qui prône un rôle protecteur de l'état cellulaire par la dérégulation de l'expression des gènes *Hox*, est supportée dans un premier temps par Cillo (1995) qui a

proposé que l'organisation du patron d'expression des gènes Hox dans les poumons joue un rôle semblable à celui des gènes onco-suppresseurs. Dans un second temps, les protéines homéotiques peuvent activer l'expression de plusieurs gènes onco-suppresseurs. Par exemple, le gène *mg1-1* est une cible du gène *Hoxc-8* (Tomotsune et al., 1993), le gène de la protéine p53 est une cible de HOXA-5 (Raman et al., 2000) et le gène du régulateur du cycle cellulaire *p21^{waf/cip1}* est une cible de HOXA-10 (Bromleigh et Freedman, 2000).

Le gène *Hoxa-1* est un candidat important parmi ceux susceptibles de manifester des propriétés oncogéniques. Chez l'humain, une expression ectopique de la protéine Hoxa-1 a été rapportée dans de nombreux cancers du sein (Chariot et Castronovo, 1996). De plus, Shen et al. (2000) ont démontré que la sur-expression de la protéine Hoxa-1 exerce un contrôle sur le niveau d'expression de gènes impliqués dans la survie le contrôle du cycle cellulaire, comme les gènes de la superoxide dismutase et de la cadhérine-6, de protéines impliquées dans la transcription tels que SAP-18 et HMG-1 ainsi que le gène de la protéine de liaison au rétinoblastome 2 (Rb-2). D'après nos résultats, la protéine Hoxa-1 est relativement sur-exprimée dans les cellules pulmonaires des souris RAR β 4-LIKE.

Dans les cancers, l'expression du gène *Hoxa-2* est très variable. Dans des tumeurs colorectales primaires et métastatiques, le gène *Hoxa-2* est inactif, alors qu'il est exprimé dans les cellules colorectales normales (de Vita et al., 1993). Par contre, dans différents types de leucémie, son expression est inchangée (Barba et al., 1993). Nos résultats

montrent que la protéine Hoxa-2 est sur-exprimée chez les cellules pulmonaires des souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3 et RAR β 4-LIKE, alors qu'elle est plutôt sous-exprimée chez les cellules pulmonaires AS-RAR β 2. Aucune conclusion ne peut être formulée à partir de nos résultats sur la nature oncogénique ou suppresseur de tumeur du gène *Hoxa-2*. D'autres études devront être accomplies afin de définir l'implication possible du gène *Hoxa-2* dans l'oncogénèse pulmonaire.

Le gène *Hoxa-4* pourrait être un gène onco-suppresseur. Dans des poumons humains normaux, l'expression de la protéine Hoxa-4 est très forte (Golpon et al., 2001). De plus, le patron d'expression du gène *Hoxa-4* varie beaucoup dans les cancers colorectaux primaires et métastatiques (de Vita et al., 1993). Chez les cellules pulmonaires de nos souris transgéniques des modèles AS-RAR β 1/ β 3 et AS-RAR β 2, la protéine Hoxa-4 est surtout sous-exprimée, comme dans les cancers colorectaux primaires et métastatiques (de Vita et al., 1993). D'autres expériences devront être effectuées pour confirmer le rôle onco-suppresseur du gène *Hoxa-4*. Il serait intéressant d'identifier à cette fin des gènes cibles de la protéine Hoxa-4.

Le gène *Hoxa-5* pourrait être un oncogène ou un gène suppresseur de tumeur. Celui-ci est essentiel à l'organogénèse et au fonctionnement des voies respiratoires (Aubin et al., 1997; Kim et Nielsen; 2000). De plus, l'invalidation du gène *Hoxa-5* cause la perte d'expression de facteurs de transcription impliqués dans l'oncogénèse des cellules pulmonaires comme le «Thyroid Transcription Factor 1» (TTF-1; Ordonez, 2000), l'«Hepatocyte Nuclear Factor 3 β » (HNF3 β ; Jetton et al., 1998) et l'oncogène bien connu

N-MYC (Aubin et al., 1997; Zajac-Kaye; 2001; Hermeking, 2003). Des études ont aussi suggéré que la protéine HOXA-5 est un régulateur de l'expression des récepteurs à la progestérone chez l'humain (Raman et al., 2000). L'altération du niveau de ce récepteur par rapport à ceux du récepteur de l'œstrogène présent dans les cellules de la glande mammaire pourrait être à l'origine des cancers mammaires (Anderson, 2002). Donc, la protéine Hoxa-5 contrôle l'expression de facteurs de transcription impliqués dans l'oncogenèse. D'autre part, la sur-expression de la protéine HOXA-5 induit la protéine p53 dans les cancers du sein humains (Raman et al., 2000). De plus, la perte d'expression du gène *HOXA-5* pourrait provoquer la perte d'expression de p53 (Raman et al., 2000). Or, la dérégulation de l'expression de la protéine p53 favoriserait le développement et la progression de l'oncogenèse chez les cellules pulmonaires (Osada et Takahashi, 2002). Chez nos souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3 et RAR β 4-LIKE, la protéine Hoxa-5 est sur-exprimée par rapport aux cellules contrôles. Le rôle exact de *Hoxa-5* dans l'oncogenèse pulmonaire reste à démontrer.

Le gène *Hoxa-7* est considéré comme un oncogène, au même titre que le gène *Hoxa-1*. Maulbecker et Gruss (1993) ont rapporté que la sur-expression de la protéine Hoxa-7 chez des cellules primaires les transforme. De plus, le gène *Hoxa-7* est impliqué dans l'embryogenèse de la région thoracique de la souris (Cillo et al., 2001). Enfin, le gène *Hoxa-7* est exprimé dans les cancers pulmonaires de type SCLC primaires et métastatiques (Cillo, 1994). Chez nos souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3, la protéine Hoxa-7 est sur-exprimée chez les cellules pulmonaires. Des études supplémentaires devront être effectuées dans le but de s'assurer des propriétés oncogéniques de *Hoxa-7*.

En résumé, nous avons montré des variations dans l'expression des gènes *Hoxa* en réponse à des modifications de l'expression des isoformes de RAR β . La combinaison de différents niveaux d'expression des gènes *Hox*, potentiellement oncogéniques ou suppresseur de tumeur, pourrait être impliquée dans le processus d'oncogenèse pulmonaire. Des études d'expression par immunobuvardage afin de déterminer le niveau des différents isoformes de RAR β dans les souris transgéniques AS-RAR β 1/ β 3, AS-RAR β 2 et RAR β 4-LIKE, ainsi que le niveau des différentes protéines *Hoxa* dans les pneumocytes de type II et les cellules de Clara pourraient appuyer nos résultats. De plus, des études futures sur les cibles de chacun de ces gènes et sur les différents effets de la modification de leur expression permettront de déterminer le rôle des gènes *Hoxa* dans l'oncogenèse pulmonaire.

6. CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous avons démontré que les différents isoformes de RAR β moduleraient l'expression des gènes homéotiques du groupe A. Les variations d'expression dans les pneumocytes de type II et les cellules de Clara de nos différents modèles de souris transgéniques affectent positivement et négativement l'expression des gènes *Hoxa*. Les isoformes RAR β 1, RAR β 2 et RAR β 3 du récepteur RAR β régulent positivement ou négativement l'expression des gènes *Hoxa*, alors que l'isoforme RAR β 4 régule positivement l'expression de ces mêmes gènes. En parallèle, nous avons démontré l'expression du gène *Hoxa-5* chez les pneumocytes de type II normaux et transgéniques des lignées RAR β 4-LIKE par immunobuvardage.

Éventuellement, il serait intéressant de vérifier le niveau d'expression et la localisation des produits des gènes *Hoxa* par immunobuvardage classique d'extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques de pneumocytes de type II et de cellules de Clara transgéniques. De plus, l'identification des cibles des gènes homéotiques par micropuces d'ADN permettrait de mieux établir leur rôle oncogénique ou suppresseur de tumeur. Enfin, l'établissement de lignées cellulaires pulmonaires de pneumocytes de type II pourrait être un atout afin de vérifier le rôle de chacun des gènes *Hoxa* dans l'oncogenèse pulmonaire.

7. REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr Jacques Bérard pour m'avoir permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire.

Merci aux Dr Asselin et Paquette, mes correcteurs, pour leur bon travail.

Également, je tiens à souligner la contribution du personnel de l'animalerie de la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke, de M. Ghassan Bkaily Junior et de M. Léonid Volkov à mon apprentissage des différentes techniques de laboratoire. Tous ces travailleurs dans l'ombre des chercheurs sont essentiels et m'ont enrichi sur tous les plans.

Merci particulièrement à mes collègues du département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire et surtout Christian Bellehumeur, Hugo Garneau et Jean-François Delabre pour tous ce que vous avez partagé avec moi.

Et enfin, je remercie spécialement mes proches qui m'ont encouragé moralement et financière au cours de mes études pré-universitaires et universitaires.

8. BIBLIOGRAPHIE

Aberdam D, Negreanu V, Sachs L, Blatt C. (1991). The oncogenic potential of an activated Hox-2.4 homeobox gene in mouse fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*. 11 (1): 554-7.

Alland L., Muhle R., Hou H. Jr, Potes J., Chin L., Schreiber-Agus N., DePinho R.A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature*. 387(6628): 49-55.

Anderson E. (2002). The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Research*. 4 (5): 197-201.

Apiou F., Flagiello D., Cillo C., Malfoy B., Poupon M. F., Dutrillaux B. (1996). Fine mapping of human HOX gene clusters. *Cytogenetic and Cell Genetics*. 73 (1-2): 114-5.

Aranda A. et Pascual A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*. 81 (3): 1269-1304.

Aubin J., Lemieux M., Tremblay M., Berard J., Jeannotte L. (1997). Early postnatal lethality in Hoxa-5 mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Developmental Biology*. 192 (2): 432-45.

Aubin J., Lemieux M., Tremblay M., Behringer R. R., Jeannotte L. (1998). Transcriptional interferences at the Hoxa4/Hoxa5 locus: importance of correct Hoxa5 expression for the proper specification of the axial skeleton. *Developmental Dynamics*. 212 (1): 141-56.

Ausubel F. M. et al. (1990). Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publisher Associates et Wiley-Interscience ; New York.

Baniahmad A., Kohne A. C., Renkawitz R. (1992). A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *EMBO Journal*. 11(3): 1015-23.

Barba P., Magli M. C., Tiberio C., Cillo C. (1993). Hox gene expression in human cancers. Advances in Nutrition and cancer. Zappia V. et al., Plenum Press, New York.

Bastien J., Adam-Stitah S., Riedl T., Egly J. M., Chambon P., Rochette-Egly C. (2000). TFIIH interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *Journal of Biological Chemistry*. 275 (29): 21896-904.

Beamer B. A., Negri C., Yen C. J., Gavrilova O., Rumberger J. M., Durcan M. J., Yarnall D. P., Hawkins A L., Griffin C. A., Burns D. K., Roth J., Reitman M., Shuldiner A. R. (1997). Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor-gamma (hPPAR gamma) gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 233: 756-9.

- Begin R. (1998). Asbestos exposure and pleuropulmonary cancer *Revue des Maladies Respiratoires*. 15: 723-30.
- Benbrook D., Lernhardt E., Pfahl M. (1988). A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature*. 333: 669-672.
- Berard J., Gaboury L., Landers M., De Repentigny Y., Houle B., Kothary R., Bradley W. E. (1994). Hyperplasia and tumours in lung, breast and other tissues in mice carrying a RAR beta 4-like transgene. *EMBO Journal*. 13 (23): 5570-80.
- Berard J., Laboune F., Mukuna M., Masse S., Kothary R., Bradley W. E. (1996). Lung tumors in mice expressing an antisense RARbeta2 transgene. *FASEB Journal*. 10: 1091-97.
- Berard J., Luo H., Chen H., Mukuna M., Bradley W. E., Wu J. (1997). Abnormal regulation of retinoic acid receptor beta2 expression and compromised allograft rejection in transgenic mice expressing antisense sequences to retinoic acid receptor beta1 and beta3. *The Journal of Immunology*. 159: 623-34.
- Berrodin T. J., Marks M. S., Ozato K., Linney E., Lazar M. A. (1992). Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, and an endogenous liver protein. *Journal of Molecular Endocrinology*. 6: 1468-78.
- Bogue C. W., Gross I., Vasavada H., Dynia D. W., Wilson C. M., Jacobs H. C. (1994). Identification of Hox genes in newborn lung and effects of gestational age and retinoic acid on their expression. *American Journal of Physiology*. 266 (4 Pt 1): L448-54.
- Boulet A. M., Capecchi M. R. (1996). Targeted disruption of hoxc-4 causes esophageal defects and vertebral transformations. *Developmental Biology*. 177 (1): 232-49.
- Brambilla E., Lantuejoul S., Sturm N. (2000). Divergent differentiation in neuroendocrine lung tumors. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 17 (2): 138-48.
- Brambilla C., Spiro S. (2001). Highlights in lung cancer. *European Respiratory Journal*. 18 (4): 617-8.
- Brand N., Petkovich M., Krust A., Chambon P., de The H., Marchio A., Tiollais P., Dejean A. (1988). Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature*. 332: 850-53.
- Bromleigh V. C., Freedman L. P. (2000). p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. *Genes and Development*. 14: 2581-86.
- Bucan M., Yang-Feng T., Colberg-Poley A. M., Wolgemuth D. J., Guenet J. L., Francke U., Lehrach H. (1986). Genetic and cytogenetic localisation of the homeo box containing

genes on mouse chromosome 6 and human chromosome 7. *EMBO Journal*. 5 (11): 2899-905.

Buckley S., Driscoll B., Anderson K. D., Warburton D. (1997). Cell cycle in alveolar epithelial type II cells: integration of Matrigel and KGF. *American Journal of Physiology*. 273 (3 Pt 1): L572-80.

Burbee D. G., Forgacs E., Zochbauer-Muller S., Shivakumar L., Fong K., Gao B., Randle D., Kondo M., Virmani A., Bader S., Sekido Y., Latif F., Milchgrub S., Toyooka S., Gazdar A. F., Lerman M. I., Zbarovsky E., White M., Minna J. D. (2001). Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *Journal of National Cancer Institute*. 93 (9): 691-9.

Calvo K. R., Knoepfler P., McGrath S., Kamps M. P. (1999). An inhibitory switch derepressed by pbx, hox, and Meis/Prep1 partners regulates DNA-binding by pbx1 and E2a-pbx1 and is dispensable for myeloid immortalization by E2a-pbx1. *Oncogene*. 18 (56): 8033-43.

Campbell, N. A. (1995). La biologie. 3^e Édition, Éditions ERPI, Montréal.

Campling B. G., El-Deiry W. S. (2003). Clinical implications of p53 mutations in lung cancer. *Methods in Molecular Medicine*. 75: 53-77.

Celetti A., Barba P., Cillo C., Rotoli B., Boncinelli E., Magli M. C. (1993). Characteristic patterns of HOX gene expression in different types of human leukemia. *International Journal of Cancer*. 53 (2): 237-44.

Cersosimo R. J. (2002). Lung cancer: a review. *American Journal of Health-System Pharmacists*. 59 (1): 611-42.

Chakravarti D., LaMorte V. J., Nelson M. C., Nakajima T., Schulman I. G., Juguilon H., Montminy M., Evans R. M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature*. 383: 99-103.

Chambon P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB Journal*. 10: 940-54.

Chang C. P., Shen W. F., Rozenfeld S., Lawrence H. J., Largman C., Cleary M. L. (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes and Development*. 9: 663-74.

Chariot A, van Lint C, Chapelier M, Gielen J, Merville MP, Bours V. (1999). CBP and histone deacetylase inhibition enhance the transactivation potential of the HOXB7 homeodomain-containing protein. *Oncogene*. 18 (27): 4007-14.

Chariot A, Castronovo V. (1996). Detection of HOXA1 expression in human breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 222 (2): 292-7.

Chaturvedi S., Chaturvedi S. (2001) Carcinogenicity of asbestos: convincing evidence, conflicting interests. *National Medicine Journal of India*. 14 (1): 43-6.

Cho S., Chung J. J., Choe Y., Choi H. S., Han Kim D., Rhee K., Kim K. (2001). A functional retinoic acid response element (RARE) is present within the distal promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene. *Brain Research- Molecular Brain Research*. 87 (2): 204-13.

Chytil F. (1996). Retinoids in lung development. *FASEB Journal*. 10 (9):986-92.

Cillo C. (1994). HOX genes in human cancers. *Invasion and Metastasis*. 95 (14): 38-49.

Cillo C, Faiella A, Cantile M, Boncinelli E. (1999). Homeobox genes and cancer. *Experimental Cell Research*. 248 (1):1-9.

Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. (2001). Homeobox genes in normal and malignant cells. *Journal of Cell Physiology*. 188 (2):161-9.

Clagett-Dame M., Plum L. A. (1997). Retinoid-regulated gene expression in neural development. *Critical Reviews Eukaryot Gene Expression*. 7 (4): 299-342.

Clayton, R. M. et Truman, D. E. (1982). Stability and switching in cellular differentiation. *Advance in experimental medicine and biology*, v. 58, Plenum Publishing Corporation, New York.

Cohen R. N., Brzostek S., Kim B., Chorev M., Wondisford F. E., Hollenberg A. N. (2001). The specificity of interactions between nuclear hormone receptors and corepressors is mediated by distinct amino acid sequences within the interacting domains. *Molecular Endocrinology*. 15: 1049-61.

Corti M, Brody AR, Harrison JH. (1996). Isolation and primary culture of murine alveolar type II cells. *American Journal of Respiratory Cellular and Molecular Biology*. 14 (4): 309-15.

Crestani B. et Aubier M. (1995). Function of pneumocyte II. *La revue du Praticien (Paris)*. 45: 2124-26.

Costa RH, Kalinichenko VV, Lim L. (2001). Transcription factors in mouse lung development and function. *American Journal of Physiology*. 280 (5):L823-38.

Crestani B, Aubier M. (1995). Function of pneumocytes II. *La Revue du Praticien*. 45 (17): 2124-6.

Crowe D. L. (1998). Retinoic acid receptor beta induces terminal differentiation of squamous cell carcinoma lines in the absence of cyclin-dependent kinase inhibitor expression. *Cancer Research*. 58 (1): 142-8.

Dahl A. R., Grossi I. M., Houchens D. P., Scovell L. J., Placke M. E., Imondi A. R., Stoner G. D., De Luca L. M., Wang D., Mulshine J. L. (2000). Inhaled isotretinoin (13-cis retinoic acid) is an effective lung cancer chemopreventive agent in A/J mice at low doses: a pilot study. *Clinical Cancer Research*. 6 (8): 3015-24.

Dammann R., Li C., Yoon J. H., Chin P. L., Bates S., Pfeifer G.P. (2000). Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nature Genetics*. 25: 315-9.

Dang T. P., Gazdar A. F., Virmani A. K., Sepetavec T., Hande K. R., Minna J. D., Roberts J. R., Carbone D. P. (2000). Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 92 (16): 1355-7.

Delmotte M. H., Tahayato A., Formstecher P., Lefebvre P. (1999). Serine 157, a retinoic acid receptor alpha residue phosphorylated by protein kinase C in vitro, is involved in RXR.RARalpha heterodimerization and transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*. 274 (53): 38225-31.

de Luca L.M. (1991). Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB Journal*. 5(14): 2924-33.

de Vita G., Barba P., Odartchenko N., Givel J. C., Freschi G., Bucciarelli G., Magli M. C., Boncinelli E., Cillo C. (1993). Expression of homeobox-containing genes in primary and metastatic colorectal cancer. *European Journal of Cancer*. 29A (6): 887-93.

de Mello D. E., Mahmoud, S., Padfield P. J., Hoffmann J. W. (2000). Generation of an immortal differentiated lung type-II epithelial cell line from the adult H-2KbtsA58 transgenic mouse. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*. 36: 374-82.

Di Rocco G., Mavilio F., Zappavigna V. (1997). Functional dissection of a transcriptionally active, target-specific Hox-Pbx complex. *EMBO Journal*. 16 (12): 3644-54.

Doerksen L. F., Bhattacharya A., Kannan P., Pratt D., Tainsky M. A. (1996). Functional interaction between a RARE and an AP-2 binding site in the regulation of the human HOX A4 gene promoter. *Nucleic Acids Research*. 24 (14): 2849-56.

Droste J. H., Weyler J. J., Van Meerbeeck J. P., Vermeire P. A., van Sprundel M. P. (1999). Occupational risk factors of lung cancer: a hospital based case-control study. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 56 (5): 322-7.

Dupe V., Davenne M., Brocard J., Dolle P., Mark M., Dierich A., Chambon P., Rijli F.M. (1997). In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development*. 124 (2): 399-410.

Dupe V., Ghyselinck N. B., Thomazy V., Nagy L., Davies P. J., Chambon P., Mark M. (1999). Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Developmental Biology*. 208 (1): 30-43.

Edwards Y. S., Sutherland L. M., Power J. H., Nicholas T. E., Murray A. W. (1999). Cyclic stretch induces both apoptosis and secretion in rat alveolar type II cells. *FEBS Letters*. 448 (1): 127-30.

Ekker S. C., Jackson D. G., von Kessler D. P., Sun B. I., Young K. E., Beachy P. A. (1994). The degree of variation in DNA sequence recognition among four Drosophila homeotic proteins. *EMBO Journal*. 13: 3351-60.

Evans T. R., Kaye S. B. (1999). Retinoids: present role and future potential. *British Journal of Cancer*. 80 (1/2): 1-8.

Ewijk, W., van Soest, P., van den Engh, G. (1981). Fluorescence Analysis and Anatomic Distribution of Mouse T Lymphocyte Subsets Defined by Monoclonal Antibodies to Antigens Thy-1, Lyl-1, Lyl-2 and T-200. *Journal of Immunology*. 127: 2594-2604.

Farboud B., Hauksdottir H., Wu Y., Privalsky M. L. (2003). Isotype-Restricted Corepressor Recruitment: a Constitutively Closed Helix 12 Conformation in Retinoic Acid Receptors beta and gamma Interferes with Corepressor Recruitment and Prevents Transcriptional Repression. *Molecular and Cellular Biology*. 23 (8): 2844-58.

Faria TN, Mendelsohn C, Chambon P, Gudas LJ. (1999). The targeted disruption of both alleles of RARbeta(2) in F9 cells results in the loss of retinoic acid-associated growth arrest. *Journal of Biological Chemistry*. 274 (38): 26783-8.

Favier B., Dollé P. (1997). Developmental functions of mammalian Hox genes. *Molecular Human Reproduction*. 3 (2): 115-31.

Fehrenbach H. (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Journal of Respiratory Research*. 2: 33-46.

Filley F. G. (1996). Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. *Chest*. 109 (3 Suppl): 14S-19S.

Flagiello D., Gibaud A., Dutrillaux B., Poupon M. F., Malfoy B. (1997). Distinct patterns of all-trans retinoic acid dependent expression of HOXB and HOXC homeogenes in human embryonal and small-cell lung carcinoma cell lines. *FEBS Letters*. 415: 263-7.

- Flieder D. B. (2002). Neuroendocrine tumors of the lung: recent developments in histopathology. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 8: 275-80.
- Folberg A., Nagy Kovacs E., Luo J., Giguere V., Featherstone M. S. (1999). RARbeta mediates the response of Hoxd4 and Hoxb4 to exogenous retinoic acid. *Developmental Dynamics*. 215 (2): 96-107.
- Folkers G. E., van der Leede B. J., van der Saag P. T. (1993). The retinoic acid receptor-beta 2 contains two separate cell-specific transactivation domains, at the N-terminus and in the ligand-binding domain. *Molecular Endocrinology*. 7: 616-27.
- Fong, K. M., Sekido Y., Minna J. D. (1999). Molecular pathogenesis of lung cancer. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Research*. 118: 1136-52.
- Franceschi S., Bidoli E. (1999). The epidemiology of lung cancer. *Annals of Oncology*. 10 (suppl.5): S3-S6.
- Frangioni J. V., Moghal N., Stuart-Tilley A., Neel B. G., Alper S. L. (1994). The DNA binding domain of retinoic acid receptor beta is required for ligand-dependent suppression of proliferation. Application of general purpose mammalian coexpression vectors. *Journal of Cell Science*. 107: 827-38.
- Fujino T, Suzuki A, Ito Y, Ohyashiki K, Hatano Y, Miura I, Nakamura T. (2002). Single-translocation and double-chimeric transcripts: detection of NUP98-HOXA9 in myeloid leukemias with HOXA11 or HOXA13 breaks of the chromosomal translocation t(7;11)(p15;p15). *Blood*. 99 (4): 1428-33.
- Furomoto H., Ihara M. (2002). Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer. *Journal of Medical Investigation*. 49 (3-4): 124-33.
- Galant R., Walsh C. M., Carroll S. B. (2002). Hox repression of a target gene: extradenticle-independent, additive action through multiple monomer binding sites. *Development*. 129(13): 3115-26.
- Galis F. (1999). Why do almost all mammals have seven cervical vertebrae? Developmental constraints, Hox genes, and cancer. *Journal of Experimental Zoology*. 285: 19-26.
- Gazdar A. F. (1994). The molecular and cellular basis of human lung cancer. *Anticancer Research*. 14 (1B): 261-7.
- Gazdar A. F., Carney D. N., Minna J. D. (1983). The biology of non-small cell lung cancer. *Seminars in Oncology*. 10 (1): 3-19.

- Gazdar A. F., Linnoila R. I., Kurita Y., Oie H. K., Mulshine J. L., Clark J. C., Whitsett J. A. (1990). Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines. *Cancer Research*. 50: 5481-7.
- Gebert J. F., Moghal N., Frangioni J. V., Sugarbaker D. J., Neel B. G. (1991). High frequency of retinoic acid receptor beta abnormalities in human lung cancer. *Oncogene*. 6: 1859-68.
- Geisen C, Denk C, Kupper JH, Schwarz E. (2000). Growth inhibition of cervical cancer cells by the human retinoic acid receptor beta gene. *International Journal of Cancer*. 85 (2): 289-95.
- Geradts J. (2003). Abrogation of the RB-p16 tumor suppressor pathway in human lung cancer. *Methods in Molecular Medicine*. 74: 89-99.
- Geradts J., Chen J. Y., Russell E. K., Yankaskas J. R., Nieves L., Minna J. D. (1993). Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. *Cell Growth and Differentiation*. 4: 799-809.
- Germain P., Iyer J., Zechel C., Gronemeyer H. (2002). Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature*. 415 (6868): 187-92.
- Ghering W. J. (1993). Exploring the homeobox Gene. *Gene*. 135: 215-221.
- Giguere V., Ong E. S., Segui P., Evans R. M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*. 330 (6149): 624-9.
- Giguere V., Shago M., Zirngibl R., Tate P., Rossant J., Varmuza S. (1990). Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor gamma expressed in the mouse embryo. *Molecular and Cellular Biology*. 10 (5): 2335-40.
- Giguere V. (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocrine Reviews*. 15 (1): 61-79.
- Golpon H. A., Geraci M. W., Moore M. D., Miller H. L., Miller G., Tuder R. M., Voelkel N. F. (2001). HOX genes in human lung: altered expression in primary pulmonary hypertension and emphysema. *American Journal of Pathology*. 158 (3): 955-66.
- Goodman F. R. (2002). Limb malformations and the human HOX genes. *American Journal of Medical Genetics*. 112: 256-65.
- Goodman FR, Scambler PJ. (2000). Human HOX gene mutations. *Clinical Genetics*. 59 (1): 1-11.
- Gould V. E., Warren W. H. (2000). Epithelial tumors of the lung. *Chest Surgery Clinics of North America*. 10(4): 709-28.

Greenberg A. K., Yee H., Rom W. N. (2002). Preneoplastic lesions of the lung. *Respiratory Research*. 3: 20.

Greenblatt M. S., Bennett W. P., Hollstein M. et al. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*. 54: 4855-78.

Gutierrez J. A., Ertsey R., Scavo L. M., Collins E., Dobbs L. G. (1999). Mechanical distention modulates alveolar epithelial cell phenotypic expression by transcriptional regulation. *American Journal of Respiratory Cellular and Molecular Biology*. 21(2): 223-9.

Haidar M. A., Manshouri T., Keating M. J., Kantarjian H. M., Freireich E. J., Mehta K., Albitar M. (2000). Downregulation of the p53 tumor suppressor gene and upregulation of the bcl-2 gene in retinoic acid receptor alpha-deficient transgenic mice. *International Journal of Oncology*. 16(3): 561-5.

Hansen L. A., Sigman C. C., Andreola F., Ross S. A., Kelloff G. J., De Luca L. M. (2000). Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis*. 21 (7): 1271-9.

Hao Z., Yeung J., Wolf L., Doucette R., Nazarali A. (1999). Differential expression of Hoxa-2 protein along the dorsal-ventral axis of the developing and adult mouse spinal cord. *Developmental Dynamics*. 216 (2): 201-17.

Harlan W. R. Jr, Margraf J. H., Said S. I. (1966). Pulmonary lipid composition of species with and without surfactant. *American Journal of Physiology*. 211: 855-61.

Hauksdottir H, Farboud B, Privalsky ML. (2003). Retinoic acid receptors beta and gamma do not repress, but instead activate target gene transcription in both the absence and presence of hormone ligand. *Molecular Endocrinology*. 17 (3): 373-85.

Hayashi K., Yokozaki H., Naka K., Yasui W., Lotan R., Tahara E. (2001). Overexpression of retinoic acid receptor beta induces growth arrest and apoptosis in oral cancer cell lines. *Japanese Journal of Cancer Research*. 92 (1): 42-50.

Heinzel T., Lavinsky R. M., Mullen T. M., Soderstrom M., Laherty C. D., Torchia J., Yang W. M., Brard G., Ngo S. D., Davie J. R., Seto E., Eisenman R. N., Rose D. W., Glass C. K., Rosenfeld M. G. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*. 387 (6628): 43-8.

Hermeking H. (2003). The MYC oncogene as a cancer drug target. *Current Cancer Drug Targets*. 3 (3): 163-75.

Hershko AY, Kafri T, Fainsod A, Razin A. (2003). Methylation of HoxA5 and HoxB5 and its relevance to expression during mouse development. *Gene*. 302 (1-2): 65-72.

Hibi K., Takahashi T., Yamakawa K., Ueda R., Sekido Y., Ariyoshi Y., Suyama M., Takagi H., Nakamura Y., Takahashi T. (1992). Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene*. 7: 445-9.

Hills B.A. (1999). An alternative view of the role(s) of surfactant and the alveolar model. *Journal of Applied Physiology*. 87 (5): 1567-83.

Hodgkinson J. E., Davidson C. L., Beresford J., Sharpe P. T. (1993). Expression of a human homeobox-containing gene is regulated by 1,25(OH)₂D₃ in bone cells. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1174 (1): 11-6.

Hood JK, Silver PA. (1999) In or out? Regulating nuclear transport. *Current Opinion in Cell Biology*. 2: 241-7.

Horan G. S., Wu K., Wolgemuth D. J., Behringer R. R. (1994). Homeotic transformation of cervical vertebrae in Hoxa-4 mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 91 (26): 12644-8.

Horlein A. J., Naar A. M., Heinzl T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Soderstrom M., Glass C. K., et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 377 (6548): 397-404.

Houle B., Leduc F., Bradley W. E. (1991). Implication of RARB in epidermoid (Squamous) lung cancer. *Genes and Chromosomes in Cancer*. 3 (5): 358-66.

Houle B., Rochette-Egly C., Bradley W. E. (1993). Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 90: 985-89.

Hsieh J. C., Whitfield G. K., Oza A. K., Dang H. T., Price J. N., Galligan M. A., Jurutka P. W., Thompson P. D., Haussler C. A., Haussler M. R. (1999). Characterization of unique DNA-binding and transcriptional-activation functions in the carboxyl-terminal extension of the zinc finger region in the human vitamin D receptor. *Journal of Biochemistry*. 38 (49):16347-58.

Hsu M. H., Palmer C. N., Song W., Griffin K. J., Johnson E. F. (1998). A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *Journal of Biological Chemistry*. 273 (43): 27988-97.

- Huang, D. Chen S. W. et Lorraine J. (2002). Analysis of Two Distinct Retinoic Acid Response Elements in the Homeobox Gene Hoxb1 in Transgenic Mice. *Developmental Dynamics*. 223 (3): 353-70.
- Hurst RE, Waliszewski P, Waliszewska M, Bonner RB, Benbrook DM, Dar A, Hemstreet GP 3rd. (1999). Complexity, retinoid-responsive gene networks, and bladder carcinogenesis. *Advance in Experiental and Medical Biology*. 462: 449-67.
- Izon DJ, Rozenfeld S, Fong ST, Komuves L, Largman C, Lawrence HJ. (1998). Loss of function of the homeobox gene Hoxa-9 perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood*. 92 (2): 383-93.
- Jacks I., Weinberg R. A.. (1998). The expanding role of cell cycle regulators. *Science*. 280: 1035-37.
- Jackson R. J., Adnane J., Coppola D., Cantor A., Sebt S. M., Pledger W. J. (2002). Loss of the cell cycle inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1) enhances tumorigenesis in knockout mouse models. *Oncogene*. 21 (55): 8486-97.
- Jetton TL, Moates JM, Lindner J, Wright CV, Magnuson MA. (1998). Targeted oncogenesis of hormone-negative pancreatic islet progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*. 95 (15): 8654-9.
- Jinno H., Steiner M. G., Nason-Burchenal K., Osborne M. P., Telang N.T. (2002). Preventive efficacy of receptor class selective retinoids on HER-2/neu oncogene expressing preneoplastic human mammary epithelial cells. *International Journal of Oncology*. 21(1): 127-34.
- Kamb A., Gruis N. A., Weaver-Feldhaus J. et al. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. 264: 436-40.
- Kang Y., Prentice M. A., Mariano J. M., Davarya S., Linnoila R. I., Moody T. W., Wakefield L. M., Jakowlew S. B. (2000). Transforming growth factor-beta 1 and its receptors in human lung cancer and mouse lung carcinogenesis. *Experimental Lung Research*. 26 (8): 685-707.
- Kang Y., Mariano J. M., Angdisen J., Moody T. W., Diwan B. A., Wakefield L. M., Jakowlew S. B. (2000). Enhanced tumorigenesis and reduced transforming growth factor-beta type II receptor in lung tumors from mice with reduced gene dosage of transforming growth factor-beta1. *Molecular Carcinogenesis*. 29: 112-26.
- Karperien M., Farih-Sips H., Hendriks J. A., Lanske B., Papapoulos S. E., Abou-Samra A. B., Lowik C. W., Defize L. H. (1999). Identification of a retinoic acid-inducible element in the murine PTH/PTHrP (parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide) receptor gene. *Molecular Endocrinology*. 13 (7): 1183-96.

Kühnel W. (1997). Atlas de poche d'histologie : Cytologie, histologie et anatomie microscopique à l'usage des étudiants, 2e édition, Éditions Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

Kim M. H., Cho M., Park D. (1998). Sequence analysis of the 5'-flanking region of the gene encoding human HOXA-7. *Somatic Cells and Molecular Genetics*. 24 (6): 371-4.

Kim M. H., Chang H. H., Shin C., Cho M., Park D., Park H. W. (1998). Genomic structure and sequence analysis of human HOXA-9. *DNA and Cell Biology*. 17 (5): 407-14.

Kim C., Nielsen H. C. (2000). Hoxa-5 in mouse developing lung: cell-specific expression and retinoic acid regulation. *American Journal of Physiology*. 279 (5): L863-71.

Kleinerman R. A., Tarone R. E., Abramson D. H., Seddon J. M., Li F. P., Tucker M. A. (2000). Hereditary retinoblastoma and risk of lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 92 (24): 2037-39.

Klinge C. M., Jernigan S. C., Risinger K. E., Lee J. E., Tyulmenkov V. V., Falkner K. C., Prough R. A. (2001). Short heterodimer partner (SHP) orphan nuclear receptor inhibits the transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT). *Archives in Biochemistry and Biophysics*. 390 (1): 64-70.

Knoepfler P. S., Bergstrom D. A., Uetsuki T., Dac-Korytko I., Sun Y. H., Wright W. E., Tapscott S. J., Kamps M. P. (1999). A conserved motif N-terminal to the DNA-binding domains of myogenic bHLH transcription factors mediates cooperative DNA binding with pbx-Meis1/Prep1. *Nucleic Acids Research*. 27 (18): 3752-61.

Kok K., Naylor S. L., Buys C. H. (1997). Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Advances in Cancer Research*. 71: 27-92.

Kostic D., Capecchi M. R. (1994). Targeted disruptions of the murine Hoxa-4 and Hoxa-6 genes result in homeotic transformations of components of the vertebral column. *Mechanisms of Development*. 46: 231-47.

Koutsami M. K., Gorgoulis V. G., Kastrinakis N. G., Asimacopoulos P. J., Kittas C. (2002). Prognostic Factors in Non-small Cell Lung Carcinoma. *Anticancer Research*. 22: 347-79.

Kros J., Sauvageau G. (2000). AP-1 complex is effector of Hox-induced cellular proliferation and transformation. *Oncogene*. 19 (45): 5134-41.

Krust A., Kastner P., Petkovich M., Zelent A., Chambon P. (1989). A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 86: 5310-14.

- Kumar R., Thompson E. B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. 64 (5): 310-9.
- Langston A. W., Thompson J. R., Gudas L. J. (1997). Retinoic acid-responsive enhancers located 3' of the Hox A and Hox B homeobox gene clusters. Functional analysis. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (4): 2167-75.
- Lechner J. F., Wang Y., Siddiq F., Fugaro J. M., Wali A., Lonardo F., Willey J. C., Harris C. C., Pass H. I. (2002). Human lung cancer cells and tissues partially recapitulate the homeobox gene expression profile of embryonic lung. *Lung Cancer*. 37 (1): 41-7.
- Leclerc P., Jibard N., Meng X., Schweizer-Groyer G., Fortin D., Rajkowski K., Kang K., Catelli MG, Baulieu EE, Cadepond F. (1998). Quantification of the nucleocytoplasmic distribution of wild type and modified proteins using confocal microscopy: interaction between 90-kDa heat shock protein (Hsp90 α) and glucocorticosteroid receptor (GR). *Experimental Cell Research*. 242 (1): 255-64.
- Ledbetter, J. A., Herzenberg, L. A. (1979). Xenogenic Monoclonal Antibodies to Mouse Lymphoid Differentiation Antigens. *Immunological Reviews*. 47: 63-90.
- Leenhouts H. P., Brugmans M. J. (2001). Calculation of the 1995 lung cancer incidence in The Netherlands and Sweden caused by smoking and radon: risk implications for radon. *Radiation and Environmental Biophysics*. 40(1): 11-21.
- Lehmann J. M., Hoffmann B., Pfahl M. (1991). Genomic organization of the retinoic acid receptor gamma gene. *Nucleic Acid Research*. 19 (3): 573-8.
- Leid M., Kastner P., Lyons R., Nakshatri H., Saunders M., Zacharewski T., Chen J. Y., Staub A., Garnier J. M., Mader S., et al. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell*. 68: 377 -95.
- Lenny N., Westendorf J. J., Hiebert S. W. (1997). Transcriptional regulation during myelopoiesis. *Molecular Biology of the Reproduction*. 24 (3): 157-68.
- Lewis E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. 276: 565-70.
- Li Y., Dawson M. I., Agadir A., Lee M. O., Jong L., Hobbs P. D., Zhang X. K. (1998). Regulation of RAR β expression by RAR- and RXR-selective retinoids in human lung cancer cell lines: Effect on growth inhibition and apoptosis induction *International Journal of Cancer*. 75: 88-95.

- Liaudet-Coopman E. D., Berchem G. J., Wellstein A. (1997). In vivo inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis by retinoic acid in squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 3 (2): 179-84.
- Lin F., Xiao D., Kolluri S. K., Zhang X. (2001). Unique anti-activator protein-1 activity of retinoic acid receptor beta. *Cancer Research*. 60(12): 3271-80.
- Linnoila R. I., Mulshine J. L., Steinberg S. M., Funa K., Matthews M. J., Cotelingam J. D., Gazdar A. F. (1988). Neuroendocrine differentiation in endocrine and nonendocrine lung carcinomas. *American Journal of Clinical Pathology*. 90: 641-52.
- Lippman S. M., Lotan R. J. (2000). Advances in the development of retinoids as chemopreventive agents. *Journal of Nutrition*. 130 (2S Suppl): 479S-482S.
- Lokshin A., Zhang H., Mayotte J., Lokshin M., Levitt M. L. (1999). Early effects of retinoic acid on proliferation, differentiation and apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Research*. 19(6B): 5251-4.
- Lufkin T. (1997). Transcriptional regulation of vertebrate Hox genes during embryogenesis. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 7 (3): 195-213.
- Maconochie M., Nonchev S., Morrison A., Krumlauf R. (1996). Paralogous Hox genes: function and regulation. *Annual Review of Genetics*. 30: 529-56.
- Mader S., Leroy P., Chen J. Y., Chambon P. (1993). Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 268 (1): 591-600.
- Magli M. C., Barba P., Celetti A., De Vita G., Cillo C., Boncinelli E. (1991). Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 88 (14): 6348-52.
- Malkinson A. M. (1992). Primary Lung Tumors in Mice: An Experimentally Manipulable Model of Human Adenocarcinoma. *Cancer Research*. 52: 2670s-2676s.
- Malkinson A. M. (2001). Primary Lung tumors in mice as an aid for understanding, preventing and treating human adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 32: 265-79.
- Malpel S., Mendelsohn C., Cardoso W. V. (2000). Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development*. 127: 3057-67.
- Mangelsdorf D. J., Ong E. S., Dyck J. A., Evans R. M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*. 345: 224-9.

Mangelsdorf D. J., Borgmeyer U., Heyman R. A., Zhou J. Y., Ong E. S., Oro A. E., Kakizuka A., Evans R. M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes and Development*. (3): 329-44.

Mann R. S. (1995). The specificity of homeotic gene function. *Bioessays*. 17 (10): 855-63.

Marieb, H. (1999). Anatomie et physiologie humaines. 2^e Édition, Éditions ERPI, Montréal.

Mark M., Rijli F. M., Chambon P. (1997). Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatric Research*. 42 (4): 421-9.

Marshall H., Morrison A., Studer M., Popperl H., Krumlauf R. (1996). Retinoids and Hox genes. *FASEB Journal*. 10: 969-78.

Mason R. J., Kalina M., Nielsen L. D., Malkinson A. M., Shannon J. M. (2000). Surfactant protein C expression in urethane-induced murine pulmonary tumors. *American Journal of Pathology*. 156 (1): 175-82.

Massaro G. D., Massaro D., Chan W. Y., Clerch L. B., Ghyselinck N., Chambon P., Chandraratna R. A. (2000). Retinoic acid receptor-beta: an endogenous inhibitor of the perinatal formation of pulmonary alveoli. *Physiological Genomics*. 4 (1): 51-7.

Masuda A., Takahashi T. (2002). Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms and potential consequences in the pathogenesis. *Oncogene*. 21 (45): 6884-97.

Mattei M. G., de The H., Mattei J. F., Marchio A., Tiollais P., Dejean A. (1988). Assignment of the human hap retinoic acid receptor RAR beta gene to the p24 band of chromosome 3. *Human Genetics*. 80: 189-90.

Mathew S., Murty V. V., Cheifetz S., George D., Massague J., Chaganti R. S. (1994). Transforming growth factor receptor gene TGFBR2 maps to human chromosome band 3p22. *Genomics*. 20 (1):114-5.

Mattews M. J., Linnoila R. I. (1988). Lung Cancer : A comprehensive treatise, Grune & Stratton Inc., New York.

Maulbecker C. C., Gruss P. (1993). The oncogenic potential of deregulated homeobox genes. *Cell Growth and Differentiation*. 4: 431-41.

McGinnis W., Krumlauf R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell*. 68: 283-302.

McGinnis W., Levine M. S., Hafen E., Kuroiwa A., Gehring W. J. (1984). A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*. 308: 428-33.

Melvin V. S., Roemer S. C., Churchill M. E., Edwards D. P. (2002). The C-terminal extension (CTE) of the nuclear hormone receptor DNA binding domain determines interactions and functional response to the HMGB-1/-2 co-regulatory proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (28): 25115-24.

Michigami T., Suga A., Yamazaki M., Shimizu C., Cai G., Okada S., Ozono K. (1999). Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor that transfers a cytosolic protein to the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*. 274 (47): 33531-538.

Minna J. D. (1993). The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest*. 103 (Suppl. 4): 449S-456S.

Minna J. D., Mangelndorf D, J. (1997). Retinoic acid receptor expression abnormalities in lung cancer: important clues or major obstacles? *Journal of the National Cancer Institute*. 89: 602-4.

Minucci S, Leid M, Toyama R, Saint-Jeannet JP, Peterson VJ, Horn V, Ishmael JE, Bhattacharyya N, Dey A, Dawid IB, Ozato K. (1997). Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression. *Molecular and Cellular Biology*. 17 (3): 644-655.

Miyamoto T., Kakizawa T., Ichikawa K., Nishio S., Takeda T., Suzuki S., Kaneko A., Kumagai M., Mori J., Yamashita K., Sakuma T., Hashizume K. (2001). The role of hinge domain in heterodimerization and specific DNA recognition by nuclear receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 181: 229-38.

Moghal N., Neel B. G. (1995). Evidence for impaired retinoic acid receptor-thyroid hormone receptor AF-2 cofactor activity in human lung cancer. *Molecular and Cellular Biology*. 15: 3945-59.

Morrison A., Moroni M. C., Ariza-McNaughton L., Krumlauf R., Mavilio F. (1996). In vitro and transgenic analysis of a human HOXD4 retinoid-responsive enhancer. *Development*. 122 (6): 1895-907.

Muller M., Affolter M., Leupin W., Otting G., Wuthrich K., Gehring W. J. (1988). *EMBO Journal*. 7: 4299-4304.

Nagpal S., Friant S., Nakshatri H., Chambon P. (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO Journal*. 12 (6): 2349-60.

Nagpal S., Zelent A., Chambon P. (1992). RAR-beta 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR-beta 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 89: 2718-22.

Nervi C., Vollberg T. M., George M. D., Zelent A., Chambon P., Jetten A. M. (1991). Expression of nuclear retinoic acid receptors in normal tracheobronchial cells and in lung carcinoma cells. *Experimental Cell Research*. 195: 163-170.

Nikawa T., Rokutan K., Nanba K., Tokuoka K., Teshima S., Engle M. J., Alpers D. H., Kishi K. (1998). Vitamin A up-regulates expression of bone-type alkaline phosphatase in rat small intestinal crypt cell line and fetal rat small intestine. *Journal of Nutrition*. 128 (11): 1869-77.

Niklinska W., Laudanski J., Niklinski J. (2001). G1 phase of the cell cycle control and lung cancer: biological and clinical implications. *Neoplasma*. 48 (3): 157-163.

Nonchev S, Vesque C, Maconochie M, Seitanidou T, Ariza-McNaughton L, Frain M, Marshall H, Sham MH, Krumlauf R, Charnay P. (1996). Segmental expression of Hoxa-2 in the hindbrain is directly regulated by Krox-20. *Development*. 122 (2): 543-54.

Ogryzko V. V., Schiltz R. L., Russanova V., Howard B. H., Nakatani Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 87: 953-9.

Ogura T., Evans R. M. (1995). A retinoic acid-triggered cascade of HOXB1 gene activation. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 92 (2):387-91.

Oikawa T., Hirotsu K., Nakamura O., Shudo K., Hiragun A., Iwaguchi T. (1989). A highly potent antiangiogenic activity of retinoids. *Cancer Letters*. 48 (2):157-62.

Ordenez NG. (2000). Thyroid transcription factor-1 is a marker of lung and thyroid carcinomas. *Advances in Anatomical Pathology*. 7 (2): 123-7.

Osada H., Takahashi T. (2002). Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene*. 21 (48): 7421-34.

Oshita F., Kameda Y., Ikehara M., Tanaka G., Yamada K., Nomura I., Noda K., Shotsu A., Fujita A., Arai H., Ito H., Nakayama H., Mitsuda A. (2002). Increased expression of integrin beta1 is a poor prognostic factor in small-cell lung cancer. *Anticancer Research*. 22 (2B): 1065-70.

Ozeki A., Tsukamoto I. (1999). Retinoic acid repressed the expression of c-fos and c-jun and induced apoptosis in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1450 (3): 308-19.

- Packer A. I., Crotty D. A., Elwell V. A., Wolgemuth D. J. (1998). Expression of the murine *Hoxa4* gene requires both autoregulation and a conserved retinoic acid response element. *Development*. 125: 1991-98.
- Packer AI, Elwell VA, Parnass JD, Knudsen KA, Wolgemuth DJ. (1997). N-cadherin protein distribution in normal embryos and in embryos carrying mutations in the homeobox gene *Hoxa-4*. *International Journal of Developmental Biology*. 41 (3): 459-68.
- Papageorgiou S., Almirantis Y. (1996). Gradient model describes the spatial-temporal expression pattern of *Hoxa* genes in the developing vertebrate limb. *Developmental Dynamics*. 207: 461-9.
- Perlmann T., Umesono K., Rangarajan P. N., Forman B. M., Evans R. M. (1996). Two distinct dimerization interfaces differentially modulate target gene specificity of nuclear hormone receptors. *Molecular Endocrinology*. 10: 958-66.
- Perkins AC, Cory S. (1993). Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the *Hox-2.4* homeobox gene. *EMBO Journal*. 12 (10): 3835-46.
- Perkins A, Kongsuwan K, Visvader J, Adams JM, Cory S. (1990). Homeobox gene expression plus autocrine growth factor production elicits myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*. 87 (21): 8398-402.
- Peterson GL. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*. 83 (2): 346-56.
- Petkovich M., Brand N. J., Krust A., Chambon P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*. 330 (3): 444-9.
- Phelan M. L., Featherstone M. S. (1997). Distinct HOX N-terminal arm residues are responsible for specificity of DNA recognition by HOX monomers and HOX.PBX heterodimers. *Journal of Biological Chemistry*. 272 (13): 8635-43.
- Picard D., Yamamoto K. R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO Journal*. 6 (11): 3333-40.
- Piedrafita F., Pfahl M. (1999). Nuclear Retinoid Receptors and Mechanisms of Action, Retinoids. The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action. Chapitre 5, Éditions Springer, New York.
- Pitterle D. M., Jolicoeur E. M., Bepler G. (1998). Hot spots for molecular genetic alterations in lung cancer. *In vivo*. 12: 643-58.
- Prince V. (2002). The Hox Paradox: More complex(es) than imagined. *Developmental Biology*. 249: 1-15.

- Qi J. S., Desai-Yajnik V., Greene M. E., Raaka B. M., Samuels H. H. (1995). The ligand-binding domains of the thyroid hormone/retinoid receptor gene subfamily function in vivo to mediate heterodimerization, gene silencing, and transactivation. *Molecular and Cellular Biology*. 15 (3): 1817-25.
- Rabin M., Ferguson-Smith A., Hart C. P., Ruddle F. H. (1986). Cognate homeo-box loci mapped on homologous human and mouse chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 83 (23): 9104-8.
- Raman V., Martensen S. A., Reisman D., Evron E., Odenwald W. F., Jaffee E., Marks J., Sukumar S. (2000). Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*. 405: 974-78.
- Raz Y., Kelley M. W. (1997). Effects of retinoid and thyroid receptors during development of the inner ear. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 8 (3):257-264.
- Reddy K. B., Hocevar B. A., Howe P.H. (1994). Inhibition of G1 phase cyclin dependent kinases by transforming growth factor beta 1. *Journal of Cellular Biochemistry*. 56 (3): 418-25.
- Roelen B. A., de Graaff W., Forlani S., Deschamps J. (2002). Hox cluster polarity in early transcriptional availability: a high order regulatory level of clustered Hox genes in the mouse. *Mechanisms of Development*. 119 (1): 81.
- Rogatsky I., Trowbridge J. M., Garabedian M.J. (1999). Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *Journal of Biological Chemistry*. 274 (32): 22296-22302.
- Rogers M. B. (1997). Life-and-death decisions influenced by retinoids. *Current Topics in Developmental Biology*. (1997) 35:1-46.
- Rosen O., Geffen R., Avivi C., Goldstein R. S. (1996). Growth, proliferation, and cell death in the ontogeny of transient DRG (Frobie's ganglia) of chick embryos. *Journal of Neurobiology*. 30 (2): 219-30.
- Ross J. A., Rosen G. D. (2002). The molecular biology of lung cancer. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 8: 265-9.
- Salgia R. et Skarin A. T. (1998). Molecular abnormalities in lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 16 (3): 1207-17.
- Sanchez-Esteban J., Cicchiello L. A., Wang Y., Tsai S. W., Williams L. K., Torday J. S., Rubin L. P. (2001). Mechanical stretch promotes alveolar epithelial type II cell differentiation. *Journal of Applied Physiology*. 91 (2): 589-95.

- Sanchez-Esteban J., Wang Y., Cicchiello L. A., Rubin L. P. (2002). Cyclic mechanical stretch inhibits cell proliferation and induces apoptosis in fetal rat lung fibroblasts. *American Journal of Physiology*. 282 (3): L448-56.
- Santé Canada. (2002). Statistiques canadiennes sur le cancer.
- Shanmugam K., Green N. C., Rambaldi I., Saragovi H. U., Featherstone M. S. (1999). PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 19 (11): 7577-88.
- Sharkey M., Graba Y., Scott M. P. (1997). Hox genes in evolution: protein surfaces and paralog groups. *Trends in Genetic*. 13 (4): 145-51.
- Sharpless N. E., DePinho R. A. (2002). p53: good cop/bad cop. *Cell*. 110 (1): 9-12.
- Shen J, Wu H, Gudas LJ. (2000). Molecular cloning and analysis of a group of genes differentially expressed in cells which overexpress the Hoxa-1 homeobox gene. *Experimental Cell Research*. 259 (1): 274-83.
- Shi Q., Gross K. W., Sigmund C. D. (2001). Retinoic acid-mediated activation of the mouse renin enhancer. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (5): 3597-603.
- Shiraishi M., Sekiguchi A., Oates A. J., Terry M. J., Miyamoto Y. (2002). HOX gene clusters are hotspots of de novo methylation in CpG islands of human lung adenocarcinomas. *Oncogene*. 21: 3659-62.
- Sirchia S. M., Ren M., Pili R., Sironi E., Somenzi G., Ghidoni R., Toma S., Nicolo G., Sacchi N. (2002). Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. *Cancer Research*. 62 (9): 2455-61.
- Sommer K. M., Chen L. I., Treuting P. M., Smith L. T., Swisshelm K. (1999). Elevated retinoic acid receptor beta (4) protein in human breast tumor cells with nuclear and cytoplasmic localization. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 96 (15): 8651-6.
- Soncin, F., Fafeur, V., Vandenbunder, B. (1999). Transcription factors and angiogenesis *Pathologie Biologie (Paris)*. 47 (4): 358-63.
- Song M. R., Lee S. K., Seo Y. W., Choi H. S., Lee J. W., Lee M. O. (1998). Differential modulation of transcriptional activity of oestrogen receptors by direct protein-protein interactions with retinoid receptors. *Biochemistry*. 336 (pt 3): 7111-7.
- Soprano D. R., Scanlon E., Shukri M., Zhang Z. P., Soprano K. J. (2000). Murine RARbeta4 displays reduced transactivation activity, lower affinity for retinoic acid, and no anti-AP1 activity. *Journal of Cellular Biochemistry*. 77 (4): 604-14.

Sporn N. B., Suh N. (2002). Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nature Reviews on Cancer*. 2 (7): 537-43.

Srebrow A., Friedmann Y., Ravanpay A., Daniel C. W., Bissell M. J. (1998). Expression of Hoxa-1 and Hoxb-7 is regulated by extracellular matrix-dependent signals in mammary epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 69 (4): 377-91.

Su D. M., Ellis S., Napier A., Lee K., Manley N. R. (2001). *Hoxa3* and *Pax1* Regulate Epithelial Cell Death and Proliferation during Thymus and Parathyroid Organogenesis. *Developmental Biology*. 236 (2): 316-29.

Sucov H. M., Murakami K. K., Evans R. M. (1990). Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type beta gene. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 87: 5392-96.

Suh Y. A., Lee H. Y., Virmani A., Wong J., Mann K. K., Miller W. H. Jr, Gazdar A., Kurie J. M. (2002). Loss of retinoic acid receptor beta gene expression is linked to aberrant histone H3 acetylation in lung cancer cell lines. *Cancer Research*. 62: 3945-49.

Taketani T, Taki T, Ono R, Kobayashi Y, Ida K, Hayashi Y. (2002). The chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in acute myeloid leukemia results in fusion of the NUP98 gene with a HOXA cluster gene, HOXA13, but not HOXA9. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 34 (4): 437-43.

Taylor H. S. (2000). The role of HOX genes in human implantation. *Human Reproduction Update*. 6 (1): 75-79.

Taylor H. S., Arici A., Olive D., Igarashi P. (1998). HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *Journal of Clinical Investigation*. 101 (7): 1379-84.

Thacher S. M., Vasudevan J., Chandraratna R. A. (2000). Therapeutic applications for ligands of retinoid receptors. *Current Pharmaceutical Design*. 6: 21-58.

Thaete L. G., Malkinson A. M. (1991). Cells of origin of primary pulmonary neoplasms in mice: morphologic and histochemical studies. *Experimental Lung Research*. 17 (2): 219-28.

Thorsteinsdottir U., Sauvageau G., Humphries R. K. (1997). Hox homeobox genes as regulators of normal and leukemic hematopoiesis. *Hematology and Oncology Clinics of North America*. 11 (6): 1221-37.

Tiberio C., Barba P., Magli M. C., Arvelo F., Le Chevalier T., Poupon M. F., Cillo C. (1994). HOX gene expression in human small-cell lung cancers xenografted into nude mice. *International Journal of Cancer*. 58 (4): 608-15.

Tomotsune D, Shoji H, Wakamatsu Y, Kondoh H, Takahashi N. (1993). A mouse homologue of the *Drosophila* tumour-suppressor gene *l(2)gl* controlled by Hox-C8 in vivo. *Nature*. 365 (6441): 69-72.

Travis W. D. (2002). Pathology of lung cancer. *Clinics in Chest Medicine*. 23 (1): 65-81.

Tsubouchi Y., Sano H., Kawahito Y., Mukai S., Yamada R., Kohno M., Inoue K., Hla T., Kondo M. (2000). Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 270: 400-5.

Van Winkle L. S., Buckpitt A. R., Nishio S. J., Isaac J. M., Plopper C. G.. (1995). Cellular response in naphthalene-induced Clara cell injury and bronchiolar epithelial repair in mice. *American Journal of Physiology*. 269 (6, pt 1): L800-L818.

Viallet J. P., Ruberte E., du Manoir S., Krust A., Zelent A., Dhouailly D. (1991). Retinoic acid-induced glandular metaplasia in mouse skin is linked to the dermal expression of retinoic acid receptor beta mRNA. *Developmental Biology*. 144 (2): 424-8.

Vider B. Z., Zimmer A., Chastre E., Gespach C., Halperin M., Mashiah P., Yaniv A., Gazit A. (2000). Deregulated expression of homeobox-containing genes, HOXB6, B8, C8, C9, and Cdx-1, in human colon cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 272 (2): 513-8.

Virmani A. K., Rathi A., Zochbauer-Muller S., Sacchi N., Fukuyama Y., Bryant D., Maitra A., Heda S., Fong K. M., Thunnissen F, Minna J. D., Gazdar A. F. (2001). Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 92 (16): 1303-7.

Wahba G. M., Hostikka S. L., Carpenter E. M. (2001). The paralogous Hox genes Hoxa10 and Hoxd10 interact to pattern the mouse hindlimb peripheral nervous system and skeleton. *Developmental Biology*. 231: 87-102.

Wang C., Fu M., Angeletti R. H., Siconolfi-Baez L., Reutens A. T., Albanese C, Lisanti M. P., Katzenellenbogen B. S., Kato S., Hopp T., Fuqua S. A., Lopez G. N., Kushner P. J., Pestell R. G. (2001). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (21): 18375-83.

Wang L., Tankersley L. R., Tang M., Potter J. J., Mezey E. (2002). Regulation of the murine alpha(2)(I) collagen promoter by retinoic acid and retinoid X receptors. *Archives in Biochemistry and Biophysics*. 401 (2): 262-70.

Witschi H. (1990). Responses of the lung to toxic injury. *Journal of Environmental Health Perspectives*. 85: 5-13.

- Wu Q., Chen Z. M., Su W. J. (2002). Anticancer effect of retinoic acid via AP-1 activity repression is mediated by retinoic acid receptor alpha and beta in gastric cancer cells. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology*. 34 (9): 1102-14.
- Wurtz J. M., Bourguet W., Renaud J. P., Vivat V., Chambon P., Moras D., Gronemeyer H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Structural Biology*. 3 (2): 87-94.
- Xu X. C., Sozzi G., Lee J. S., Lee J. J., Pastorino U., Pilotti S., Kurie J. M., Hong W. K., Lotan R. (1997). Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *Journal of the National Cancer Institute*. 89: 624-29.
- Xu J., Tyan T., Cedrone E., Savaraj N., Wang N. (1996). Detection of 11q13 amplification as the origin of a homogeneously staining region in small cell lung cancer by chromosome microdissection. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 17 (3): 172-8.
- Yang, R., Schule D. J., Mangelsdorf D. J., Evans R. M. (1991). Characterization of DNA Binding and Retinoic Acid Binding Properties of Retinoic Acid Receptor. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 88: 3559-63.
- Yang X. J., Ogryzko V. V., Nishikawa J., Howard B. H., Nakatani Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*. 382 (6589): 319-24.
- Yau T. O., Kwan C. T., Jakt L. M., Stallwood N., Cordes S., Sham M. H. (2002). Auto/Cross-regulation of *hoxb3* expression in posterior hindbrain and spinal cord. *Developmental Biology*. 252 (2): 287-300.
- Yesner R. (1985). Large cell carcinoma of the lung. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2 (4): 255-69.
- Zabarovsky E. R., Lerman M. I., Minna J. D. (2002). Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene*. 21 (45): 6915-35.
- Zajac-Kaye M. (2001). Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. *Lung Cancer*. 34 Suppl 2:S43-6.
- Zappavigna V., Sartori D., Mavilio F. (1994). Specificity of HOX protein function depends on DNA-protein and protein-protein interactions, both mediated by the homeo domain. *Genes and Development*. 8: 732-44.

Zelent A., Krust A., Petkovich M., Kastner P., Chambon P. (1989). Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature*. 339: 714-17.

Zelent A., Mendelsohn C., Kastner P., Krust A., Garnier J. M., Ruffenach F., Leroy P., Chambon P. (1991). Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO Journal*. 10 (1):71-81.

Zhang X. K., Liu Y., Lee M. O., Pfahl M. (1994). A specific defect in the retinoic acid response associated with human lung cancer cell lines. *Cancer Research*. 54: 5663-69.

Zhang X. K., Liu Y., Lee M. O. (1996). Retinoid receptors in human lung cancer and breast cancer. *Mutation Research*. 350 (1): 267-77.

Zhuang Y, Faria TN, Chambon P, Gudas LJ. (2003). Identification and Characterization of Retinoic Acid Receptor beta(2) Target Genes in F9 Teratocarcinoma Cells. *Molecular Cancer Research*. 1 (8): 619-30.

Zochbauer-Muller S. Fong K. M., Virmani A. K., Geradts J., Gazdar A. F., Minna J. D. (2001). Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Research*. 61: 249-55.

Zou C. P., Youssef E. M., Zou C. C., Carey T. E., Lotan R. (2001). Differential effects of chromosome 3p deletion on the expression of the putative tumor suppressor RAR beta and on retinoid resistance in human squamous carcinoma cells. *Oncogene*. 20 (47): 6820-7.